

Der Einfluss von Sox9 auf Zellvitalität und Differenzierungspotential von adulten mesenchymalen Stammzellen



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
an der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Stöckl, geb. Grötschel
aus Landshut
im Jahr 2013

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.07.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Susanne Grässel

extern: Prof. Dr. Susanne Grässel

fakultätsintern: Prof. Dr. Achim Göpferich

Vorsitzender: Prof. Dr. Armin Buschauer

1. Gutachter: Prof. Dr. Achim Göpferich

2. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Grässel

3. Prüfer: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Transkriptionsfaktor Sox9	1
1.1.1	Die Rolle von Sox9 während der Chondrogenese	4
1.1.2	Die Rolle von Sox9 in adultem Gewebe	8
1.1.3	Die Rolle von Sox9 in der Tumorgenese.....	9
1.1.4	Eine Mutation von Sox9 führt zur Kampomelen Dysplasie	10
1.2	Mesenchymale Stammzellen (MSC)	11
1.2.1	MSC aus verschiedenen Gewebequellen – Knochenmark versus Fettgewebe.....	11
1.2.2	Differenzierung von MSC	12
1.2.3	Signaltransduktion in MSC	14
1.2.4	Zellzyklusregulierung in MSC.....	17
1.3	<i>Tissue Engineering</i> am Beispiel der Knorpelreparatur	19
2	Ziel der Arbeit	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Zellkultur.....	22
3.1.1	Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe	22
3.1.2	Differenzierung.....	22
3.1.2.1	Osteogenese	22
3.1.2.2	Chondrogenese	22
3.1.2.3	Adipogenese	23
3.1.3	Transfektion von EcoPack2-293 Zellen und Generierung von retroviralen Partikeln	23
3.1.4	Transiente Transfektion von MSC mit siRNA.....	24
3.1.5	Transduktion von MSC mit Retroviren	25
3.2	Molekularbiologie.....	25
3.2.1	Klonierung verwendeter Plasmide	25
3.2.1.1	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid DNA.....	26
3.2.1.2	Restriktion mittels Enzymen.....	26
3.2.1.3	Ligation	27
3.2.1.4	Transformation von Plasmid-DNA in One Shot® TOP10 chemisch kompetente E.coli Zellen.	27
3.2.1.5	Agarosegel Elektrophorese.....	28
3.2.2	RNA Isolierung aus MSC	28
3.2.2.1	Konzentrationsbestimmung, Qualitätsprüfung und cDNA Synthese	29
3.2.2.2	Quantitative real-time PCR.....	29
3.2.2.3	PCR-basierte Microarray Analyse	31

Inhaltsverzeichnis

3.3	Proteinbiochemie	31
3.3.1	Proteinisolation aus MSC	31
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	32
3.3.3	Western Blot Analyse	32
3.3.4	Osteocalcin-EIA	33
3.3.5	BrdU-Assay	34
3.3.6	Caspase Assay	34
3.3.7	Alkalische Phosphatase Assay	34
3.4	Histologie und Immunfluoreszenz	35
3.4.1	Alizarinrot S Färbung	35
3.4.2	Ölrot O Färbung	35
3.4.3	Morphometrische Auswertung	35
3.4.4	Paraffinschnitte	36
3.4.5	Weigert's Hämatoxylin und Alcianblau Färbung	36
3.4.6	Immunfluoreszenz	36
3.5	Durchflusszytometrische Messung	37
3.5.1	Zellzyklus Messung	37
3.5.2	Messung von Oberflächenmarkern	37
3.6	Inhibitionsversuche	38
3.6.1	MEK1/2 Inhibition mittels U0126	38
3.6.2	Hemmung der Transkription mittels Actinomycin D	38
3.6.3	Hemmung der Proteinsynthese mittels Cycloheximid	38
3.7	Luciferase-Reporter-Assay	39
3.8	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Vergleich zwischen ASC und BMSC	40
4.1.1	Vergleichende Analyse von Oberflächenmarkern	40
4.1.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse	42
4.2	Generierung eines Sox9 <i>Knockdowns</i> und einer Sox9 Überexpression in undifferenzierten rMSC	43
4.3	Expression verschiedener Markergene in rBMSC	45
4.4	Eine Sox9 Reduktion erhöht die Osteocalcinekretion über einen unbekannten, indirekten Mechanismus	46
4.5	Sox9 inhibiert die Apoptose in rBMSC, aber nicht in rASC	48
4.6	Sox9 verstärkt die Proliferation in rBMSC und rASC	49
4.7	Sox9 beschleunigt den Eintritt in die S-Phase in rBMSC und rASC	50
4.8	Ein PCR-basierter <i>Microarray</i> zur Untersuchung von Zellzyklus-Genen zeigt die Regulierung von <i>Schlafen-1</i> , <i>Ddit</i> und <i>Gpr132</i> nach Sox9 <i>Knockdown</i> in rBMSC	52
4.9	Der Einfluss von Sox9 auf Cyclin D1 und p21 in rASC und rBMSC	53

4.10	Sox9-abhängige Regulierung der adipogenen Differenzierung in rBMSC	55
4.10.1	Reduktion der Proteinexpression und Destabilisierung der mRNA von C/EBP β nach SOX9 Knockdown in rBMSC.....	56
4.10.2	Inhibierung der Expression von adipogenen Marker nach Sox9 Knockdown in rBMSC	57
4.10.3	Cyclin D1-unabhängige C/EBP β Inhibition und Cyclin D1-abhängige Induktion von p21 und Osteocalcin in –SOX9 rBMSC	58
4.11	Untersuchung potentieller Signalwege in rBMSC.....	59
4.11.1	Die Blockierung von MEK1/2 mittels UO126 hat keinen Einfluss auf die differentielle Expression von Cyclin D1, p21 und C/EBP β	59
4.11.2	Die Untersuchung zentraler Proteine verschiedener Signalwege ergibt keine reproduzierbare Regulierung.....	60
4.11.3	Eine verminderte Aktivierung der p38 MAPK Signalkaskade nach Sox9 <i>Knockdown</i> führt zu stabilisiertem Cyclin D1 Protein.....	61
4.12	Die Rolle von Sox9 während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung	62
4.12.1	Osteogenese	63
4.12.1.1	Verstärkte Expression osteogener Marker während der <i>in vitro</i> Osteogenese in –SOX9 rBMSC und rASC.....	63
4.12.1.2	Verstärkte Mineralisierung während der <i>in vitro</i> Osteogenese in –SOX9 rASC und tendenziell in rBMSC.....	65
4.12.1.3	Beschleunigter Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität während der Osteogenese in –SOX9 rBMSC.....	66
4.12.2	Chondrogenese in rBMSC	67
4.12.2.1	Expression chondrogener Marker in rBMSC	68
4.12.2.2	Größenmessung der Aggregate und Bewertung der Morphologie (Scoring) in rBMSC	70
4.12.2.3	Histologische Auswertung der rBMSC-Aggregate mittels Alcianblau Färbung	72
5	Diskussion.....	73
5.1	BMSC versus ASC	73
5.2	Sox9 reduziert die Apoptose in MSC via Caspase- und Bcl-2.....	75
5.3	Sox9 beeinflusst Cyclin D1-abhängig die Proliferation via p21.....	76
5.4	Sox9 beeinflusst das Differenzierungspotential von MSC	78
5.4.1	Der Einfluss von Sox9 auf die osteogene Differenzierung	78
5.4.2	Der Einfluss von Sox9 auf die adipogene Differenzierung	80
5.4.3	Der Einfluss von Sox9 auf die chondrogene Differenzierung	81
5.5	Die Rolle von Sox9 im p38 MAPK-Signalweg	83
	Zusammenfassung	86
	Summary	88
	Anhang	90
	Danksagung.....	90
	Erklärung.....	91

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf (Curriculum vitae).....	92
Veröffentlichungen.....	94
Abkürzungsverzeichnis	95
Literaturverzeichnis.....	98

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor Sox9

Das humane SOX9 Gen ist auf dem langen Arm (q) des Chromosoms 17 lokalisiert, 5,4 Kilobasen (kb) groß, besteht aus 3 Exons und kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der 509 Aminosäuren umfasst. Sox9 gehört zur Familie der Sox (**SRY-related high-mobility group [HMG] box**) Transkriptionsfaktoren, die insgesamt 20 Proteine beinhaltet. Diese Familie lässt sich wiederum anhand von Sequenzhomologien in Untergruppen unterteilen. Sox9 gehört zusammen mit Sox8 und Sox10 in die Untergruppe E (Bowles, Schepers et al. 2000). Alle Mitglieder der gesamten Familie besitzen eine als HMG- (**high mobility group**) Box bezeichnete DNA-bindende Domäne. Diese aus 79 Aminosäuren bestehende Domäne weist eine hohe Homologie zur HMG-Box des auf dem Y-Chromosom lokalisierten Transkriptionsfaktors SRY (**Sex determining region of Y-Gen**) auf, woraus die Namensgebung resultiert (Wegner 1999; Bowles, Schepers et al. 2000). Diese Domäne dient zum einen der DNA-Interaktion, wobei eine Bindung an die Konsensussequenz (A/T)(A/T)CAA(A/T)G stattfindet, und zum anderen einer Biegung der DNA (Harley, Jackson et al. 1992; Lefebvre, Li et al. 1998; Mertin, McDowall et al. 1999). Eine weitere Funktion der HMG-Box ist der Transport von Sox9 in den Zellkern, ausgelöst durch zwei Kernlokalisierungssignale (**NLS = nuclear localization signals**) an den Enden der HMG-Domäne (Sudbeck and Scherer 1997). Ein zusätzliches Exportsignal (**NES = nuclear export signal**) der HMG-Domäne regelt wiederum den Export von Sox9 aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Gasca, Canizares et al. 2002). Sox9 weist außerdem eine Prolin/Glutamin/Serin (PQS)-reiche C-terminale Transaktivierungsdomäne (TA-Domäne) (Sudbeck, Schmitz et al. 1996; Meyer, Sudbeck et al. 1997) und eine DNA-abhängige N-terminale Dimerisierungsdomäne auf (Bernard, Tang et al. 2003; Sock, Pagon et al. 2003). Eine andere, Prolin/Glutamin/Alanin (PQA)-reiche Region kann die Aktivität der Transaktivierungsdomäne nochmals verstärken, allein allerdings keine transkriptionsaktivierende Funktion hervorrufen (McDowall, Argentaro et al. 1999). Eine Übersicht über die verschiedenen Domänen des Sox9 Proteins ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Sox9 ist von einer großen Anzahl weiterer Faktoren abhängig. Potentielle Cofaktoren, wie Sox5 und Sox6, binden zusammen mit Sox9 im Promotorbereich bestimmter Zielgene, wie zum Beispiel *Col2a1* und potenzieren somit die transkriptionelle Aktivität von Sox9. Ebenso können Histon-modifizierende Enzyme oder Komponenten der allgemeinen transkriptionellen Maschinerie, wie CBP/p300, Med12, Med25 oder Wwp2, die Transaktivierungsdomäne von Sox9 binden (Akiyama and Lefebvre 2011), und somit die Aktivität beeinflussen.

Abbildung 1.2 zeigt das komplexe Zusammenspiel von Sox9 mit anderen Faktoren, wie p300, E47, Scx, Smad3/4, Sox5/6, Tip60 und Pgc1 α am *Col2a1* Promotor. Dabei erkennt und bindet das Sox9-Dimer die Sox9 Bindesequenz, der Coaktivator p300 induziert Histon-Acetylierung (Ac) und Chromatin-Entwindung. Der Smad3/4-Komplex verstärkt dabei diese Veränderungen am Chromatin, und das Heterodimer aus Scx und E47 bindet die E-Box des *Col2a1* Promotors und stimuliert zusätzlich die Expression des Gens (Huang, Zhou et al. 2000).

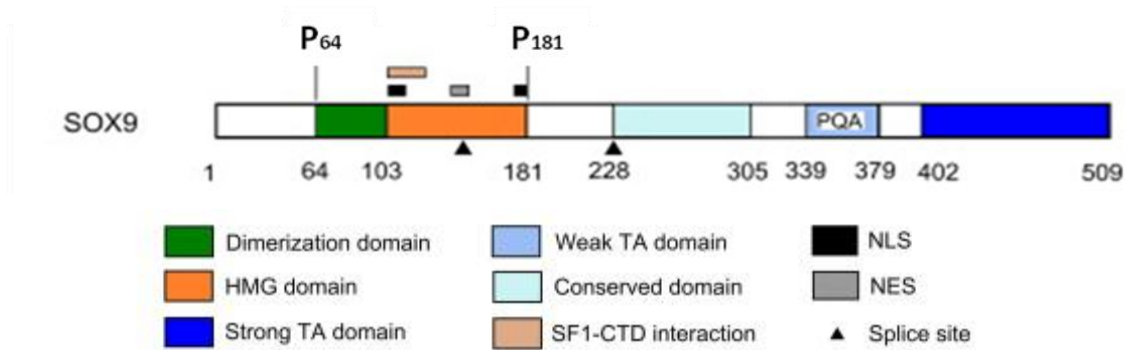


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des Sox9 Proteins. HMG=High mobility group; TA=Transaktivierung; SF1-CTD=Splicing factor 1-carboxy-terminal domain (RNA Polymerase II); NLS=Nuclear localization signal; NES=Nuclear export signal; PQA=Prolin/Glutamin/Alanin; Modifiziert nach (Barrionuevo and Scherer 2010)

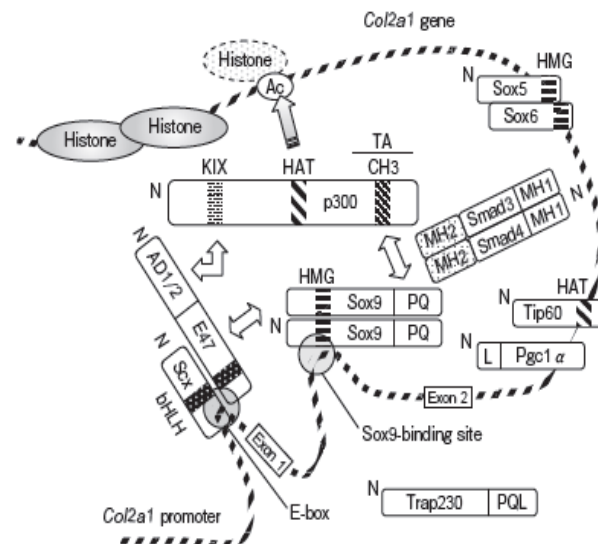


Abbildung 1.2 Modell der Sox9-abhängigen Transkription am Beispiel von *Col2a1*. Das Sox9 Homodimer erkennt die Sox9-Bindestelle und bindet an ihre HMG-Box. Gleichzeitig übernimmt der Cofaktor p300 seine Funktion als Histo-Acetyltransferase (HAT) und induziert Histon-Acetylierung (Ac) und Chromatin-Entwindung. P300 assoziiert mit seiner CH3 Domäne direkt mit Sox9 an deren PQ (Prolin/Glutamin)-reichen Transaktivierungsdomäne. Der Smad3/4-Komplex verstärkt über seine MH2 Domäne zusätzlich die Transkription, indem er mit Sox9 und p300 assoziiert. Das Heterodimer aus Scx (Scleraxis) und E47 stimuliert ebenso die Transkription, indem es an der E-Box des *Col2a1* Promotors bindet. Pfeile zeigen Interaktion zwischen den Molekülen beziehungsweise zwischen den Domänen an; TA=Transaktivierungsdomäne; bHLH=basic Helix-Loop-Helix; Tip60=Cofaktor; Trap230 (Med12)=Interaktionspartner; Pgc1α (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α*)=Cofaktor; Abbildung aus (Huang, Zhou et al. 2000)

Darüber hinaus sind verschiedene posttranslationale Mechanismen, wie etwa Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung von Sox9 bekannt, die ebenfalls die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflussen. Zum Beispiel verursacht eine Phosphorylierung durch die PKA (Protein Kinase A) eine deutliche Verstärkung der DNA-Bindeaffinität von Sox9 (Huang, Zhou et al. 2000).

Tabelle 1 Liste von Genen mit potentiellen Sox9 Interaktionsstellen in Chondrozyten. Ermittelt durch ChIP-on-chip Experimente; Tabelle modifiziert nach (Oh, Maity et al. 2010)

	Signalanzahl	Promoter	Intron	3'untranslatierte Region
Extrazelluläre Matrix Proteine				
Col2a1	2		1 und 6	
Col9a2	3		1 und 4	
Col11a1	3	✓	1	
Col11a2	1	✓	1	
Col1a1	2		1	✓
Matrillin 1	3	✓	3	
Matrillin 4	4		1 und 7	✓
Aggrecan	2	✓		
Syndecan-3	2		1	
Cdrap	1	✓	1	
ADAM-TS5	1		1	
MMP9	3		1 und 10	✓
Biglycan	2	✓	1	
Fibromodulin	1	✓	1	
Prelp	2	✓		
Chondroadherin	1		1	
Signal Cut off<15				
Fibronectin	1	✓	1	
Linkprotein	1		1	
Epiphygan	2	✓	1	
Cathepsin B	1	✓		
Transkriptionsfaktoren				
Sox9	2		1 und 2	
Sox5	4	✓	1 und 2	
Lef1	1		3	
Stat1	1		4	
Tip60	1	✓	1	
Osx	1	✓		
Runx2	2		1 und 2	
Signalmoleküle				
Grb10	1		1	
Patched	3	✓	13	
IGF2R	1		10	
VEGF	1		1	
CTGF	1	✓		
EGFR	1		5	
α-catenin	2		1 und 11	
Signal Cut off<15				
BMP4	1			✓
Chordin	1			✓
Noggin	1	✓		
PTHrP	1			
TGFβ3	2	✓		
IL-1a	1			✓
ERK1	1		1	
ERK2	1	✓	1	
PKA	1			✓
P38	1		1	

Nicht nur die Aktivität und Bindeaffinität, sondern auch die Expression des Transkriptionsfaktors selber, wird durch viele Faktoren beeinflusst. Darunter befinden sich Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Transkriptionsfaktoren, wie unter anderem Sonic Hedgehog, SP1, CREB und HIF1α

(Amarilio, Viukov et al. 2007; Piera-Velazquez, Hawkins et al. 2007). Nicht zuletzt kann auch die mRNA-Stabilität von Sox9, zum Beispiel durch p38 MAPK Aktivierung, reguliert werden, wie Simon R. Tew und Timothy E. Hardingham zeigen konnten (Tew and Hardingham 2006).

Diese Vielzahl von transkriptioneller, translationaler, posttranskriptioneller und posttranslationaler Modifikationen von Sox9, sowie die Vielzahl von potentiellen Cofaktoren, lässt bereits die essentielle gewebe-, differenzierungs- und entwicklungsspezifische Rolle von Sox9 erahnen.

Tabelle 1 zeigt eine Liste von Genen mit potentiellen Bindestellen für Sox9 in Chondrozyten. Diese Gene stellen somit mögliche Zielgene des Transkriptionsfaktors dar. Für einen Teil der Gene konnte die direkte Aktivierung der Transkription durch Sox9 bereits gezeigt werden, wie zum Beispiel für *Col2a1*, *Col9a2*, *Col11a2* sowie *Aggrecan* und *Cdrap* (Bell, Leung et al. 1997) (Ng, Wheatley et al. 1997) (Xie, Zhang et al. 1999).

1.1.1 Die Rolle von Sox9 während der Chondrogenese

Während der Embryonalentwicklung wird Sox9 in verschiedenen Gewebetypen und Zellen exprimiert. Vor allem in Chondrozyten und deren Vorläuferzellen, aber auch in den männlichen Keimdrüsen, in den Ohrenanlagen, in Herz, Niere und Pankreas, im Verdauungstrakt und in der Neuralleiste (Ng, Wheatley et al. 1997; Zhao, Eberspaecher et al. 1997) konnte eine Expression gezeigt werden. Hypertrophe Chondrozyten weisen dagegen keine Sox9 Expression auf, was essentiell für eine fehlerfreie enchondrale Ossifikation ist.

Bei der Chondrogenese handelt es sich um die mehrstufige Entstehung von Knorpel während der Embryogenese, was anschließend unter anderem der Skelettentwicklung dient. Dieser Prozess kann in drei Hauptschritte unterteilt werden: 1. Die Aggregation und Kondensation von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen (MSC). 2. Die Differenzierung zu reifen Chondrozyten und 3. die Entstehung von hypertrophen Chondrozyten und das Ersetzen dieser durch Knochen. Dies passiert zum Beispiel während der Entwicklung von Röhrenknochen, wie in Abbildung 1.3 schematisch gezeigt ist, und wird als enchondrale Ossifikation bezeichnet. Sox9 steuert diese Differenzierungsschritte maßgeblich, und ist unverzichtbar für die Generierung von funktionsfähigem Knorpel- und Knochengewebe (Lefebvre and Smits 2005). Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Schritte der Chondrogenese im Verlauf der enchondralen Ossifikation beschrieben:

1. Aggregation und Kondensation von undifferenzierten MSC: Durch Mitglieder der TGF- β (*transforming growth factor β*) Superfamilie (TGF- β 1, - β 2, - β 3), sowie durch verschiedene BMPs (*bone morphogenic proteins*) (BMP-2, -4, -6, -7), wird die Sox9 Expression induziert (Karsenty and Wagner 2002). Aus Mausstudien weiß man, dass die Inaktivierung von Sox9 während der Embryogenese in keimenden Gliedmaßen vor der mesenchymalen Kondensation zum kompletten Verlust des Knorpels und der Knochenstruktur in den betreffenden Zellen führt (Akiyama, Chaboissier et al. 2002).

Wird Sox9 erst nach der mesenchymalen Kondensation inhibiert, kommt es zu einer generalisierten Chondrodysplasie (Akiyama, Chaboissier et al. 2002). Zelladhäsionsmoleküle

wie N-Cadherin (Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion), NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (Zell-Zell-Adhäsion) und andere Matrixmoleküle wie Tenascin C und Versican spielen außerdem für diesen Prozess der Kondensation eine wichtige Rolle (Oberlander and Tuan 1994; Hall and Miyake 2000).

2. Differenzierung zu reifen Chondrozyten: Zellen im Inneren dieses kondensierenden Aggregats beginnen dann, unter der Kontrolle von Sox9, die Transkriptionsfaktoren Sox5 und Sox6 sowie Kollagen Typ II, IX, XI und Aggrecan zu exprimieren. In den äußeren Zellen, die später zum Perichondrium (Knorpelhaut) werden, wird die Sox9 Expression inhibiert. Im Inneren setzt ein starker Wachstumsprozess durch proliferierende Zellen und durch Matrixaufbau ein. Frühe Chondroblasten ordnen sich säulenförmig an, ändern ihre Form von runden zu abgeflachten Zellen, verringern ihre Proliferationsrate und entwickeln sich weiter zu prähypertrophen Chondrozyten. Dies wird vor allem durch FGFs (*fibroblast growth factors*), BMPs, PTHrP/IHH (*Parathyroid Hormone-related Peptide / Indian Hedgehog*) und dem Wnt-Signalweg gesteuert (Goldring, Tsuchimochi et al. 2006).
3. Entstehung von hypertrophen Chondrozyten: Im primären Ossifikationszentrum kommt es im nächsten Schritt zur Vaskularisierung und Bildung der kortikalen Knochenmanschette. Am Rand dieses Zentrums befindet sich die Zone der hypertrophen (Zunahme der Zellgröße) Chondrozyten. Das Abschalten der Sox9 Expression ist Voraussetzung für die terminale, hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten. Typisch für hypertrophe Chondrozyten ist die bis zu 10-fache Zunahme des Zellvolumens, die Expression von Kollagen Typ X unter der Kontrolle von Runx2 und letztendlich der Abbau durch Chondroklasten, beziehungsweise die Apoptoseinduktion. Osteoblasten ersetzen den hypertrophen Knorpel und es kommt zur Mineralisierung/Kalzifizierung der ECM (*extracellular matrix*) (Magne, Vinatier et al. 2005). Im Bereich des primären Ossifikationszentrums kommt es schließlich zur Bildung der primären Markhöhle.

Neben dem primären Ossifikationszentrum bildet sich im Verlauf des Knochenwachstums ein weiteres, sekundäres Ossifikationszentrum im Bereich der Epiphyse. Unterhalb dieses zweiten Verknöcherungsherds liegt die Wachstumsfuge, auch Epiphysenfuge genannt. Sie besteht aus nicht-permanentem, hyalinem Knorpel, ist für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich und verknöchert schließlich im Laufe der Pubertät. Bei Mäusen und Ratten verknöchert die Wachstumsfuge nicht, sondern bleibt permanent erhalten, ist aber in adulten Tieren inaktiv. Man kann verschiedene Bereiche innerhalb der Wachstumsfuge unterscheiden: Die Zone der ruhenden Zellen (Reservezone), die für den zellulären Nachschub sorgt, darunter die Proliferationszone mit säulenförmig angeordneten, sich teilenden Chondrozyten, anschließend die prähypertrophe Zone, die in einen hypertrophen Bereich übergeht, und letztendlich die Verknöcherungszone in der die Epiphysenfuge und der mineralisierte Bereich des primären Ossifikationszentrums verschmelzen (Kronenberg 2003). Sox9 wird in der Wachstumsfuge von der Zone der ruhenden Chondrozyten bis hin zum prähypertrophen Bereich stark exprimiert, in der hypertrophen und mineralisierten Zone jedoch abgeschaltet, und trägt so maßgeblich zur

Steuerung des Längenwachstums der Knochen bei. Eine Sox9 Deletion in den Chondrozyten der Wachstumsfuge führt zu einem Wachstumsstop in der Zone der proliferierenden Zellen, sowie zu frühzeitiger Hypertrophie und Mineralisierung (Dy, Wang et al. 2012), und damit zu einem erheblichen Defekt des Längenwachstums der Gliedmaße.

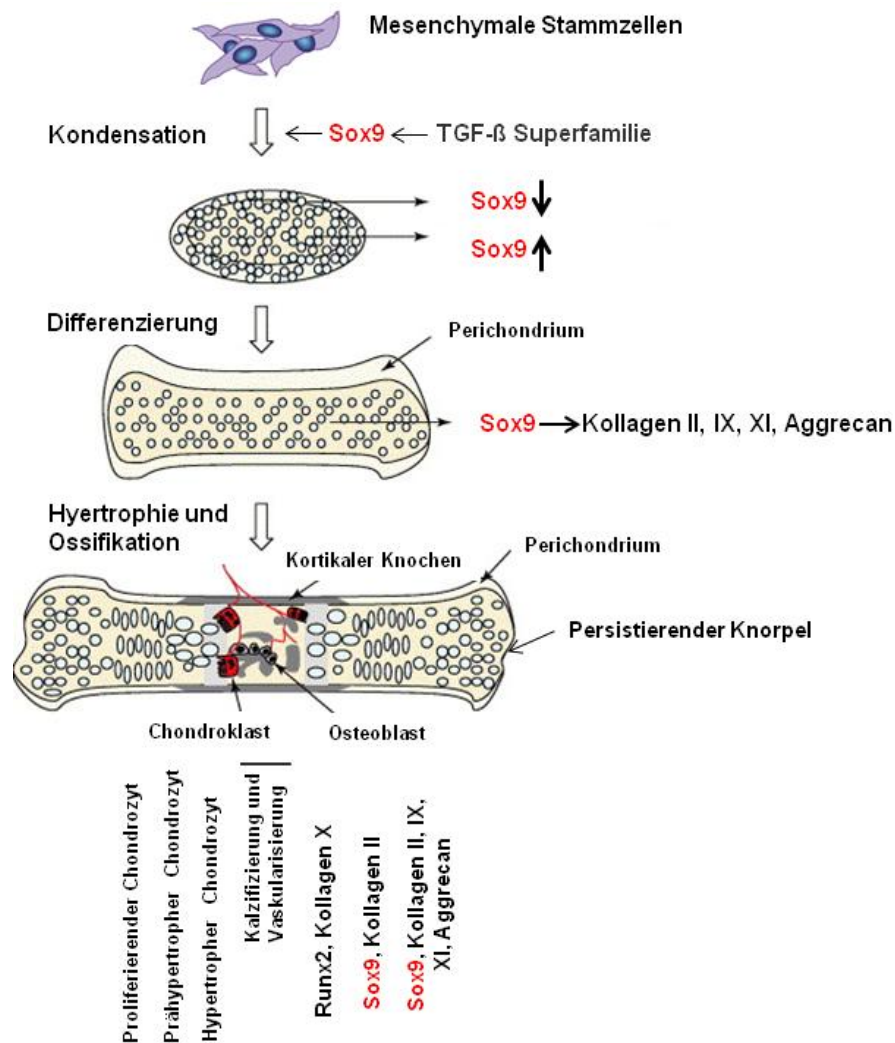


Abbildung 1.3 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten während der embryonalen Entstehung eines Röhrenknochens. Nach Aggregation und Kondensation von MSC differenzieren diese zu Chondrozyten und, im nächsten Schritt, zu hypertrophen Chondrozyten. Diese werden in primären Ossifikationszentren durch Chondroklasten abgebaut und durch Osteoblasten ersetzt. Anschließend kommt es zur Verknöcherung und Vaskularisierung der extrazellulären Matrix; Modifiziert nach (Magne, Vinatier et al. 2005)

Im Gegensatz zur Wachstumsfuge entwickeln sich Chondrozyten im permanenten Gelenkknorpel nicht weiter zu hypertrophen Chondrozyten und machen nur ca. 3-5% des ECM-Volumens aus (Pearle, Warren et al. 2005). Sie sind dort als einzige Zellen verantwortlich für das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der ECM. Diese besteht vor allem aus Kollagenen und Proteoglykanen. Abbildung 1.4 zeigt, dass die ECM aus einem heterofibrillärem Netzwerk von hauptsächlich Kollagen

Typ II, VI, IX und XI sowie Adaptermoleküle wie COMP und Matrilin-1/-3 aufgebaut ist. Kollagenmoleküle sind aus jeweils drei einzelnen langen Polypeptidketten aufgebaut, die zu einer Helix umeinander gewunden sind. Mehrere dieser Kollagenhelices lagern sich, nicht bündig, sondern etwas versetzt, zu Kollagenfibrillen zusammen. Diese Fibrillen weisen dadurch ein typisches Bänderungsmuster auf (Cole 2011) und vernetzen sich untereinander stabil, was maßgeblich zur hohen Belastungsfähigkeit des Knorpelgewebes beiträgt. Hydroxylysin dient dabei der Verankerung von kovalenten Quervernetzungen zwischen einzelnen Kollagenmolekülen sowie zwischen ganzen Kollagenfibrillen. Aggrecan ist das Proteoglykan, welches in der extrafibrillären Matrix am häufigsten vorkommt. Die Bindung von Aggrecan an Hyaluronsäure (HA) wird durch Linker-Proteine unterstützt und stabilisiert, wodurch Proteoglykan-Aggregate entstehen. (Yang, Zhang et al. 1998). Dadurch wird die gesamte Vernetzung der ECM stabilisiert und der Knorpel erhält seine elastische Eigenschaft. Andere kleine Proteoglykane, wie Decorin und Biglycan, spielen ebenso eine wichtige Rolle durch ihre Adhäsionseigenschaften (Prydz and Dalen 2000). Durch die negative Ladung der Proteoglykane weisen diese eine große Kapazität auf Wasser zu binden, was 65-80% des Knorpels ausmacht (Prydz and Dalen 2000). Chondrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Integrine ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta$). Diese Transmembranrezeptoren, die vor allem an Kollagene und Fibronectin binden können, sind von zentraler Bedeutung für die Zell-Matrix-Adhäsion sowie für die Integrität der Matrix (Integrins. 2010, Gullberg). Da Sox9 als Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan steuert, trägt Sox9 maßgeblich zur Synthese von ECM-Makromolekülen bei.

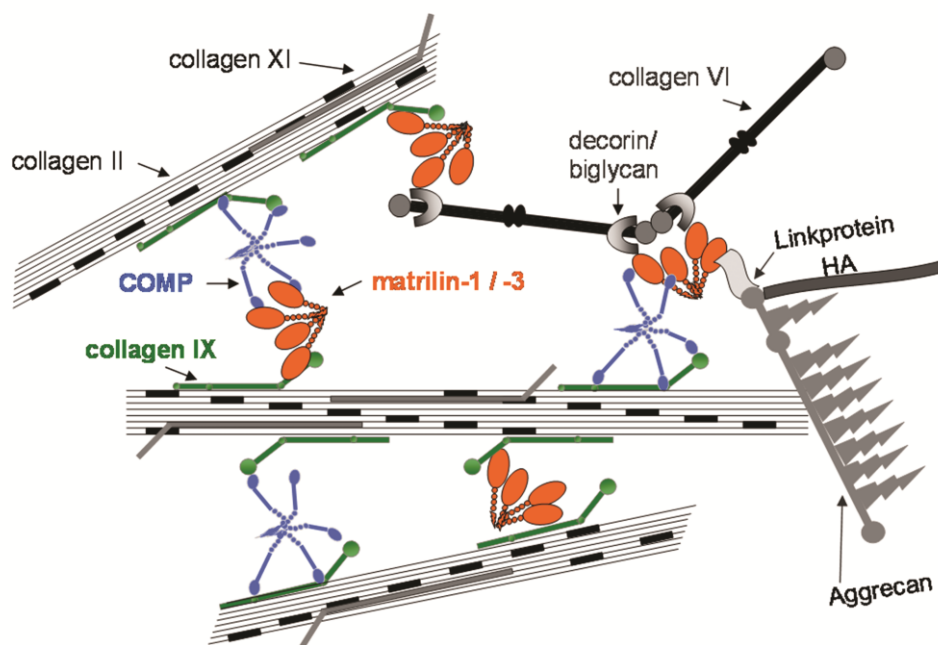


Abbildung 1.4 Vereinfachter Aufbau der ECM-Struktur eines hyalinen Knorpels. Chondrozyten, als einzige Zellen des Knorpels, sind eingebunden in eine extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Kollagenen und Proteoglykanen besteht. Zahlreiche kleine Moleküle wie COMP, Decorin, Biglycan und Matrilin sowie Komplexe aus Hyaluronsäure (HA) und Aggrecan assoziieren mit den verschiedenen Kollagenen, um das komplexe Netzwerk der ECM aufzubauen. Abbildung aus (Zaucke and Grassel 2009)

Knorpel ist avaskulär, alymphatisch und nicht innerviert, und weist dadurch nur eine geringe Regenerationsfähigkeit auf. Fokale Traumata des Gelenkknorpels können unbehandelt zu Osteoarthritis führen. Diese degenerative Krankheit verändert die Struktur des Knorpels und die Aktivität der Chondrozyten dramatisch. Die Expression von ECM-Proteinen wird eingestellt, wohingegen die Expression von matrixabbauenden Proteasen aktiviert wird (Troeberg and Nagase 2012). Damit einhergehend ist oft ein abnehmender Sox9 Expressionslevel beobachtet worden (Murakami, Lefebvre et al. 2000), so dass der Transkriptionsfaktor vermutlich eine zentrale Rolle in der Knorpelhomöostase sowie im Verlauf der Osteoarthritis spielt.

1.1.2 Die Rolle von Sox9 in adultem Gewebe

Zahlreiche Studien berichten, dass Sox9 nicht nur einen Einfluss auf die Chondrogenese während der Embryonalentwicklung, sondern auch auf die Vitalität verschiedener adulter Zellen hat. Dabei sind es nicht nur mesenchymale Stammzellen oder Chondrozyten, in denen Sox9 zentrale biologische Funktionen beeinflussen kann.

So hat eine Überexpression von Sox9 in Keratinozyten zum Beispiel einen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Effekt sowie ein verringertes epidermales Differenzierungspotential zur Folge (Shi, Sohn et al. 2013).

Sox9 wird, genau wie das Adhäsionsmolekül CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), in normaler Magenschleimhaut exprimiert. In der Karzinogenese sind die beiden Proteine allerdings hochgradig assoziiert (Liu, Shang Guan et al. 2012), was einen Einfluss von Sox9 auf das Adhäsionsverhalten von Magenschleimhautzellen vermuten lässt.

In *Bulge*-Zellen von Haarfollikeln wurde ebenfalls eine Expression von Sox9 nachgewiesen, die vermutlich dazu beiträgt, die epidermale Regeneration und Reepithelialisierung von Wunden anzutreiben (Mardaryev, Meier et al. 2011).

Ebenso zeigte sich in den Wundläsionen von Aknepatienten eine besonders starke Sox9 Expression, vor allem in den basalen Keratinozyten, wobei die Rolle in der Aknepathogenese allerdings noch weitgehend ungeklärt ist (Chen, Yang et al. 2006).

Eine Mausstudie in adulten Tieren konnte eine Sox9 Expression im Pankreas zeigen (Mead, Wang et al. 2013), die genaue Rolle in diesem Organ bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen. Es wird dabei aber auf jeden Fall eine Verbindung mit der adulten Regenerationsfähigkeit vermutet. Ebenso zeigen Basalzellen der Prostata eine Sox9 Expression, die die Entwicklung dieser Zellen zu steuern scheint, und das lumenale Epithel aufrecht erhält (Wang, McKnight et al. 2007).

In Darmepithelzellen konnten Bastide et al. zeigen, dass durch eine Inaktivierung von Sox9 die Differenzierung von Goblet- und Paneth-Zellen gestört war und eine veränderte Morphologie des Kolonepithels gefunden werden konnte. Es kam außerdem zu einer Hyperplasie der Darmzellen und zu einer erhöhten Wachstumsrate in Verbindung mit einer veränderten Wnt-Signaltransduktion. Sox9 trägt also zum einen zur Regulierung der Differenzierung von intestinalen Epithelzellen bei, zum anderen könnte der Verlust von Sox9 allerdings auch onkogen auf die Zellen wirken (Bastide, Darido et al. 2007).

1.1.3 Die Rolle von Sox9 in der Tumorgenese

Neben diversen Funktionen in adulten Geweben, vor allem in verschiedenen epithelialen Zellen, ist Sox9 mit der Entstehung einer Vielzahl von Karzinomen assoziiert. Widersprüchliche Studien belegen, dass Sox9 die Entstehung und Progression von vielen Tumoren begünstigen kann, wohingegen andere Krebsarten durch Sox9 inhibiert werden. Während in den meisten Tumoren wie etwa der Haut, Prostata, Lunge oder Gehirn Sox9 überexprimiert wird (siehe Tabelle 2) und somit als Onkogen wirkt, gibt es auch Melanome, in denen Sox9 als Tumorsuppressor fungiert (Passeron, Valencia et al. 2009). Diese Ambivalenz bezüglich der Funktion von Sox9 gilt zum Beispiel auch für kolorektale Krebserkrankungen, in denen auf der einen Seite eine Sox9 Überexpression gefunden werden konnte (Lu, Fang et al. 2008), auf der anderen Seite wurde für eine kolorektale Krebszellenlinie (HT-29Cl.16E) gezeigt, dass die Tumorigenität durch Sox9 reduziert werden kann (Darido, Buchert et al. 2008). Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von Tumorarten, bei denen eine veränderte, zumeist erhöhte Sox9 Expression gezeigt werden konnte.

Tabelle 2 Einige Beispiele von Tumorarten die mit Sox9 assoziiert sind.

Krebsart/Zellen	Sox9 Expression	Quelle
Prostata Krebs	Hoch; stimuliert Invasion und Initiation;	(Cai, Wang et al. 2013) (Huang, Hurley et al. 2012) (Zhong, Qin et al. 2012) (Zhang, Cowper-Salari et al. 2012)
Brustkrebs (<i>basal-like breast cancer</i>)	Hoch; korreliert mit einer schlechten Prognose;	(Wang, He et al. 2013)
Leberzellkarzinom	Hoch; korreliert mit Progression; funktioniert über miRNA-101;	(Zhang, Guo et al. 2012) (Guo, Xiong et al. 2012)
Duktales Pankreas-Adenokarzinom	Niedrig; kaum Sox9-positive Zellen im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe;	(Tanaka, Kuroki et al. 2013).
Intraduktale papilläre muköse Neubildung des Pankreas	Niedrig; Expression korreliert negativ mit der Tumorprogression;	(Tanaka, Kuroki et al. 2013)
Gebärmutterhals-Plattenepithel-Karzinom	Hoher Methylierungslevel von Sox9;	(Wu, Liang et al. 2013)
Magenkrebs	Hoch; Expression ist assoziiert mit Wachstum, Invasion und Metastasierung;	(Shao, Shao et al. 2012) (Liu, Shang Guan et al. 2012)
Maligne Gliome	Hoch; korreliert mit schlechter Prognose;	(Wang, He et al. 2012)
Gebärmutterschleimhaut-Karzinom (Endometriumkarzinom)	Hoch; Expression ist hochgradig assoziiert mit Wachstum und Malignität;	(Saegusa, Hashimura et al. 2012)
Lungenkarzinom	Hoch; korreliert mit schlechter Prognose und Überlebensdauer;	(Zhou, Ye et al. 2012) (Jiang, Fang et al. 2010) (McKinlay 2010)
Mesenchymales Chondrosarkoma	Hohe Expression in einigen Grad 3 Chondrosarkoma; Sox9	(Fanburg-Smith, Auerbach et al. 2010)

	markiert knorpeligen Bereich des Sarkoms;	(Soderstrom, Bohling et al. 2002)
Basalzellkarzinom und Adnexale Neubildung (Eierstock/Eileiter)	Sox9 dient als ein Marker für Basalzellkarzinom;	(Vidal, Ortonne et al. 2008)
Melanoma	Sox9 wirkt als Tumorsuppressor;	(Passeron, Valencia et al. 2009)
Neuroepithelialer Tumor	Hoch;	(Kordes and Hagel 2006)
Kolonkarzinom	Hoch; Aber auch anti-onkogenes Potential wurde berichtet; viel trunkiertes Sox9;	(Lu, Fang et al. 2008) (Panza, Pazienza et al. 2013) (Abdel-Samad, Zalzal et al. 2011)
Blasenkrebs	Konstitutiv hoch; DNA Hypermethylierung von Sox9;	(Ling, Chang et al. 2011) (Aleman, Adrien et al. 2008)

1.1.4 Eine Mutation von Sox9 führt zur Kampomelen Dysplasie

1999 wurde beobachtet, dass eine Duplikation von Sox9 zu einer XX-Geschlechtsumkehr führte (Huang, Wang et al. 1999). Dieser sehr seltenen Mutation steht eine weit besser untersuchte, genetische Veränderung von Sox9 gegenüber, die heterozygote *de novo* Mutation.

Eine heterozygote *de novo* Mutation im und am Sox9 Gen führt zu einer seltenen Fehlbildung des Skelettapparats, welche als Kampomele Dysplasie oder Kampomelie bezeichnet wird. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 0,5-1:100000 Geburten auf und geht oft mit einer XY-Geschlechtsumkehr einher. Während der Sertoli-Zelldifferenzierung des embryonalen Testikels aktiviert Sox9 die Transkription von AMH (**A**nti-**M**üllersches-**H**ormon), um die Rückbildung der Müllerschen Gänge zu steuern. Passiert dies nicht, entwickeln sich trotz eines XY-Karyotyp Ovar und Vagina. Außerdem ist Sox9 ein Zielgen von SRY (**S**ex determining region of **Y**). Zum ersten Mal von Foster et al. im Jahr 1994 beschrieben (Foster, Dominguez-Steglich et al. 1994), weisen bei der Kampomelen Dysplasie aber vor allem die Skelettelemente, die im Rahmen der enchondralen Ossifikation aus Knorpelvorstufen entstehen (siehe 1.1.1), erhebliche Deformationen auf. Klinische Merkmale sind eine unverhältnismäßig kurze Statur, gebogene Gliedmaßen, tief sitzende Ohren, ein flacher Nasenrücken, ein Spitz-Klumpfuß, ein langes Philtrum (Oberlippenrinne) und eine Fehlbildung des Gesichtsschädels (Mikrognathie). Radiologische Auffälligkeiten, die auf die Haploinsuffizienz von Sox9 zurückgeführt werden können, sind gebogene Röhrenknochen, eine Schulterblatt-Hypoplasie, kleine Beckenschaufeln und ein schmaler Thorax mit verkürzten Rippen. Neben diesen Defekten des Skelettapparats wurden auch häufig Fehlbildungen des Herzens und anderer innerer Organe gefunden (Foster, Dominguez-Steglich et al. 1994; Wagner, Wirth et al. 1994). Die Schwere der Ausprägung hängt vom Ort und der Art der Mutation ab. Eine Mutation in der HMG-Domäne verhindert meist die DNA-Bindung von Sox9 und führt somit zum Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors. Eine Mutation in der Dimerisierungsdomäne unterbindet jedoch lediglich die Aktivierung von Zielgenen, die eine dimere Sox9-Bindestelle besitzen (siehe 1.1). Dies betrifft vor allem Gene für die Chondrogenese (*Col2a1*, *Col11a2*, *Col9a2*), nicht aber Gene für die Geschlechtsbildung (Bernard, Tang et al. 2003).

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Friedenstein und seinen Kollegen gelang es zum ersten mal 1966 aus Knochenmark mesenchymale Stammzellen (MSC) zu isolieren (Friedenstein, Petrakova et al. 1968). Diese wurden zu der Zeit noch als „*colony forming units*“ oder „*plastic adherent cells*“ bezeichnet (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970). Aber bereits damals konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Vorläuferzellen das Potential haben, zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (Friedenstein, Petrakova et al. 1968).

Ein klarer Vorteil dabei ist, dass MSC im Vergleich zu embryonalen Stammzellen als ethisch unbedenklich gelten, trotzdem aber die Fähigkeit zur Differenzierung mitbringen (Pittenger, Mackay et al. 1999). Darüber hinaus verfügen sie über eine sehr hohe Proliferationsrate. MSC aus 2 ml Knochenmarksaspirat können innerhalb von etwa drei Wochen bis zu 500-fach vermehrt werden, was zu einer theoretischen Ausbeute von 12,5 bis 37,5 Millionen Zellen führt. Diese zeigen dann bis circa Passage sechs bis zehn Pluripotenz (Spees, Gregory et al. 2004). Im Gegenteil zu embryonalen Stammzellen, die multi- oder sogar totipotent sind, ist die Pluripotenz von MSC allerdings ein Nachteil. Außerdem handelt es sich bei den isolierten Zellen meist um eine heterogene Population aus verschiedenen Zelltypen, die im Knochenmarkstroma persistieren. Darunter sind Fibroblasten, Osteoblasten, Adipozyten, Knochenbelegzellen und Perizyten (Bianco, Cao et al. 2013) sowie MSC in verschiedenen Reife- beziehungsweise Differenzierungsstadien (Bruder, Jaiswal et al. 1997) und vor allem hämatopoetische Vorläuferzellen. Um die MSC Population und deren Zusammensetzung genauer zu charakterisieren, können verschiedene Oberflächenmarker untersucht werden. Es gibt derzeit noch keinen alleinigen MSC-Marker. Daher hat man sich auf die folgenden Minimalkriterien geeinigt: Die Zellen müssen positiv sein für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105, und negativ für CD11b oder CD14, für CD19 oder CD79a, für CD34, CD45 und HLA-DR, um sie als MSC identifizieren (da Silva Meirelles, Caplan et al. 2008), und von hämatopoetischen Stammzellen, deren Ursprung ebenfalls das Knochenmark ist, unterscheiden zu können.

1.2.1 MSC aus verschiedenen Gewebequellen – Knochenmark versus Fettgewebe

Seit dem Beginn der MSC Forschung vor fast 50 Jahren gab es zahlreiche Untersuchungen und Studien zu mesenchymalen Stammzellen, die ihr großes Potential für die regenerative Medizin zeigten. Außer aus Knochenmark konnten MSC mittlerweile aus vielen verschiedenen Geweben isoliert werden, wie zum Beispiel aus dem Fettgewebe (Zuk, Zhu et al. 2002), aus dem Periosteum (Nakahara, Dennis et al. 1991), der synovialen Membran (De Bari, Dell'Accio et al. 2001) wie auch aus Nabelschnurblut (Can and Karahuseyinoglu 2007) oder der Lunge (Sabatini, Petecchia et al. 2005).

Neben den gut charakterisierten Knochenmarks-MSC stellen Stammzellen aus dem Fettgewebe die wohl attraktivste Alternative dar. Vorteile des Fettgewebes, im Vergleich zum Knochenmark als Quelle für MSC, sind zum einen die Menge an vorhandenem Gewebe und zum anderen die leichte Zugänglichkeit für eine potentielle Entnahme. Die wenig invasive Methode zur Gewinnung von Lipoaspiraten ist deutlich preisgünstiger und für den Patienten weniger schmerzhaft. Laut Fraser et al.

zeigt Fettgewebe im Vergleich zu Knochenmark eine 2500-fach höhere Stammzellichte (Fraser, Zhu et al. 2008), was zu einer weniger langen oder sogar überflüssigen *in vitro* Expansion führen könnte. Hinzu kommt die schnellere Proliferationsrate von MSC aus dem Fettgewebe, die von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert wird (Zhu, Du et al. 2012) (Reich, Raabe et al. 2012). Über die Fähigkeit in bestimmte Zelltypen zu differenzieren gibt es allerdings kontroverse Ergebnisse. So berichten Reich et al. von einem verstärkten Potential zur chondrogenen Differenzierung von Kaninchen Knochenmarks-MSC im Vergleich zu MSC aus dem Fettgewebe (Reich, Raabe et al. 2012), wohingegen Havlas et al. eine gleich gute Fähigkeit der beiden Stammzelltypen im humanen System dokumentieren (Havlas, Kos et al. 2011). Es gibt hier offensichtlich Spezies-spezifische Unterschiede, wie auch Unterschiede, die wahrscheinlich in der Isolations- und Kultivierungsmethode der MSC begründet sind. Nichts desto trotz rückt das Fettgewebe als Quelle für MSC mehr und mehr in den Fokus der Forschung und bietet eine nicht zu unterschätzende Alternative für MSC aus Knochenmark. Eine potentielle „Vordeterminierung“ der adulten Stammzellen durch ihre Gewebeherkunft, wie sie zum Beispiel von Jansen et al. aufgrund unterschiedlicher Genexpressionsprofile postuliert wird (Jansen, Gilissen et al. 2010), sollte allerdings bei der Entscheidung für einen Stammzelltyp auch nicht außer Acht gelassen werden.

1.2.2 Differenzierung von MSC

Die oben bereits erwähnte, multiple Differenzierungsfähigkeit ist ein weiteres Kriterium, welches mesenchymale Stammzellen erfüllen müssen. Es wurde bereits in der Vergangenheit für verschiedene Spezies *in vitro* und/oder *in vivo* gezeigt, dass MSC unter anderem zu Knochen (Bruder, Kurth et al. 1998) (Bruder, Jaiswal et al. 1997), Knorpel (Kadiyala, Young et al. 1997), Sehnen (Young, Butler et al. 1998), Muskeln (Ferrari, Cusella-De Angelis et al. 1998), Fettgewebe (Prockop 1997), Astrozyten (Wislet-Gendebien, Wautier et al. 2005), Haut (Sasaki, Abe et al. 2008) und Hämatopoese unterstützende Stromazellen (Prockop 1997) differenzieren können (Abbildung 1.5). Pittenger et al. (Pittenger, Mackay et al. 1999) konnten allerdings zeigen, dass etwa nur ein Drittel einer ursprünglich aus Knochenmark isolierten MSC Population pluripotent war. Der Rest der Zellen zeigte nur noch tri-, bi-, oder unipotente Differenzierungsfähigkeit zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten.

Das Schicksal einer mesenchymalen Stammzelle in einen bestimmten Zelltyp zu differenzieren wird durch das Anschalten genetischer Programme festgelegt. Die drei am besten untersuchten Differenzierungspfade sind die Osteo-, Chondro- und Adipogenese. Auf die transkriptionelle Regulierung der Osteogenese und Adipogenese soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Die Chondrogenese, und die Rolle von Sox9 darin, wurden bereits in 1.1.1 erläutert.

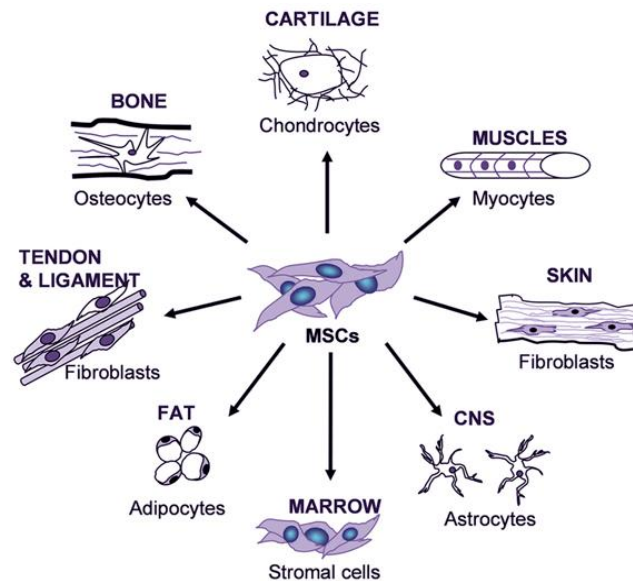


Abbildung 1.5 Mesenchymale Stammzellen besitzen das Potential in verschiedene Gewebetypen der mesenchymalen Linie zu differenzieren; Abbildung aus (Grassel and Ahmed 2007)

Osteogenese:

Kondensierte mesenchymale Stammzellen können entweder direkt zu Osteoblasten differenzieren, was als desmale Osteogenese (Ossifikation) bezeichnet wird, oder indirekt über eine knorpelige Vorlage (siehe 1.1.1) im Rahmen der enchondralen Osteogenese (Ossifikation).

Der erste Schritt dabei ist die Entstehung von Osteoprogenitorzellen, die sowohl Sox9 als auch Runx2 (Cbfa1) und Osterix exprimieren, da sie noch bipolar sind, also zu Osteoblasten wie auch zu Chondrozyten differenzieren können (Zhou, Zheng et al. 2006). Danach folgt eine starke Proliferationsphase, in der die ersten matrixassoziierten Gene (*Col1a1*, *Fibronectin*, *BMP-2*, *TGF- β*) exprimiert werden. Nicht-kollagene ECM-Proteine, wie Osteopontin, Osteonectin, BSP (*bone sialoprotein*) und Osteocalcin, werden anschließend verstärkt gebildet (Lian, Javed et al. 2004) und es kommt schließlich zur Mineralisierung der ECM. 85% der Osteoblasten erreichen nicht die Endphase der Differenzierung (Osteozyt), sondern leiten vorher den programmierten Zelltod ein (Jilka, Weinstein et al. 1998). Osteozyten sind vollkommen von Knochen umgeben und können mithilfe ihrer langen Fortsätze Kontakt zueinander, wie auch zu Osteoblasten oder Knochenbelegzellen, aufnehmen (Dallas and Bonewald 2010).

Runx2 und Osterix sind die zwei Haupttranskriptionsfaktoren, die obligat für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen sind. Sie werden über den Wnt/LRP5/6-Signalweg und über BMP-2 aktiviert (Augello and De Bari 2010) und können die Transkription verschiedener Osteoblasten-spezifischer Gene induzieren. Zielgene von Runx2 in unreifen und differenzierten Osteoblasten sind unter anderem *TGF- β Rezeptor*, *Alkalische Phosphatase*, *Kollagen Typ 1 alpha 1* und *alpha 2*, *Osteopontin*, *Osteonectin*, *Vitamin D Rezeptor*, *Galectin-3*, *BSP*, *Osteocalcin* und *Mmps* (Lian, Javed et al. 2004). Osterix agiert unterhalb von Runx2 in der transkriptionellen Kaskade der Osteoblastendifferenzierung und wird durch direkte Bindung von Runx2 reguliert. Auch andere

Transkriptionsfaktoren, wie C/EBPs, Dlx5 oder Msx2, wirken auf die osteogene Differenzierung. C/EBPs können zum Beispiel einen Komplex mit Runx2 bilden und die Transkription von *Osteocalcin* regulieren (Gutierrez, Javed et al. 2002). Für Dlx5 ist bekannt, dass es ein Cofaktor von Runx2 ist (Lian, Javed et al. 2004), und Msx2 wirkt oberhalb von Runx2 und kann somit die Runx2-vermittelte Transkription während der Osteogenese beeinflussen (Tribioli and Lufkin 1999). Aber auch negative Regulatoren von Runx2, wie Twist oder Groucho/TLE, spielen zu Beginn der Osteogenese in Vorläuferzellen für den korrekten Ablauf eine wesentlich Rolle (Javed, Guo et al. 2000) (Bialek, Kern et al. 2004).

Adipogenese

Die Transkription von adipogenen Markern wird hauptsächlich von C/EBP α und C/EBP β (**C/CAAT enhancer-binding protein α und β**) sowie PPAR- γ (**peroxisome proliferator activator receptor γ**) angetrieben (Rosen and Spiegelman 2000). Es wird vermutet, dass diese wiederum über den kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg reguliert werden (Laudes 2011). Bekannt ist, dass CREB (**cAMP response element-binding protein**), C/EBP α und PPAR γ in der früheren Differenzierungsphase als positive Regulatoren wirken (Rosen and MacDougald 2006). C/EBP α induziert wiederum KLF5 (**Kruppel-like-factor 5**) (Otto and Lane 2005). In Prä-Adipozyten wird außerdem Sox9 exprimiert, jedoch im weiteren Differenzierungsprozess inhibiert. Sox9 ist vermutlich zu Beginn der Adipogenese noch vorhanden, um C/EBP β und γ zu unterdrücken und wird durch Pref-1 (**Preadipocyte factor-1**) induziert (Wang and Sul 2009). Insulin spielt bei der Differenzierung von MSC zu Adipozyten eine entscheidende Rolle und stimuliert den Prozess über mehrere Mechanismen (Rosen and MacDougald 2006), wie zum Beispiel der Bindung von IGF-1 (**Insulin-like growth factor-1**), wodurch CREB phosphoryliert und aktiviert wird. Die Morphologie von MSC während der Adipogenese ändert sich darüber hinaus stark im Verlauf des Prozesses. Prä-Adipozyten sind spindelförmige Zellen die Pref-1, Sox9 und Gata2 exprimieren. Diese Expression verschwindet völlig im reifen Zustand (Tong, Dalgin et al. 2000). Adipozyten in einem frühen Differenzierungsstadium zeigen eine sphärische, leicht gewölbte Form und exprimieren ADD1 (**adipocyte determination and differentiation factor 1**), C/EBP β , KLF5, PPAR γ , LPL (**lipoprotein lipase**), Leptin und Adiponectin. Reife Adipozyten schließlich sind große runde Zellen mit Lipidtröpfchen in ihrem Inneren, sodass der Zellkern in die Peripherie der Zelle gedrängt erscheint. Exprimiert wird hauptsächlich PPAR γ , C/EBP α , aP2 (**adipocyte protein 2**), Adiponectin und Adipsin (Gregoire, Smas et al. 1998).

1.2.3 Signaltransduktion in MSC

Die „Entscheidung“ einer mesenchymalen Stammzelle ob und in welche Richtung sie differenziert ist ein sehr komplexer Vorgang (siehe 1.2.1). Es gibt eine Vielzahl an molekularen Mechanismen und Signalwegen, die darin involviert sind. Darunter sind der Wnt-Signalweg (Iglesias-Bartolome and Gutkind 2011) wie auch der p38 MAPK (**mitogen-activated protein kinase**)-Signalweg, die beide eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie spielen (Oetztuerk-Winder and Ventura 2012). Auch Sox9 ist in verschiedenen Signalwegen entweder als Zielgen oder aber als Regulator einer Kaskade involviert.

Sox9 inhibiert zum Beispiel den Wnt/ β -catenin-Signalweg, um die Chondrozytendifferenzierung voran zu treiben (Topol, Chen et al. 2009). Außerdem kann Sox9 über den Pik3ca-Akt-Signalweg Einfluss auf das Überleben von Chondrozyten und die hypertrophe Differenzierung nehmen (Ikegami, Akiyama et al. 2011) und die Synthese der ECM über den p38 MAPK-Signalweg, (Song, Zhang et al. 2012) als Antwort auf Glukokortikoide, beeinflussen. Es ist daneben bekannt, dass Sox9 ein Ziel der BMP-, Notch- und Hedgehog-Signalkaskaden während der Chondrogenese von MSC ist, wodurch die Sox9 Aktivität beeinflusst und gesteuert werden kann (Pritchett, Athwal et al. 2011). Im Folgenden soll der Wnt- wie auch der p38 MAPK-Signalweg in MSC näher beschrieben werden:

Wnt

Der Wnt-Signalweg ist in der Lage unter anderem die Differenzierung sowie das Wachstum von mesenchymalen Stammzellen zu regulieren. Durch die Bindung an Rezeptoren der Frizzled (FZD) Familie, die sich auf der Plasmamembran von Zellen befinden, können Wnt-Proteine entweder die kanonikale oder nicht-kanonikale Signalkaskade aktivieren (Ling, Nurcombe et al. 2009). MSC exprimieren verschiedene Wnt-Liganden wie Wnt2, Wnt4, Wnt5, Wnt11 und Wnt16 und auch verschiedene Wnt-Rezeptoren wie FZD2, 3,4,5, und 6 sowie verschiedene Cofaktoren und Wnt-Inhibitoren auf ihrer Zelloberfläche (Etheridge, Spencer et al. 2004).

Die exogene Zugabe von Wnt3a führt in MSC zu einer verstärkten Proliferation und einer verminderten Apoptoserate. Darüber hinaus scheint die Aktivierung des kanonikalen Wnt-Weges die osteogene wie auch die adipogene Differenzierung zu unterdrücken (Boland, Perkins et al. 2004) (Moldes, Zuo et al. 2003), wohingegen für die chondrogene Differenzierung kontroverse Ergebnisse berichtet wurden. Möglicherweise gibt es eine duale Rolle für den Wnt-Signalweg während der Chondrogenese, abhängig vom exprimierten Wnt-Liganden sowie vom Differenzierungsstadium. Es wurde von Hartmann und Tabin zum Beispiel berichtet, dass Wnt5a in Hühnern während der Chondrogenese der Gliedmaßen die Chondrozytenreifung verlangsamt, während diese aber durch Wnt4 beschleunigt wird (Hartmann and Tabin 2000). Daneben wurde ein Einfluss der Zelldichte auf das Expressionslevel von Wnt Proteinen in MSC ermittelt, wodurch wiederum die Differenzierungsentscheidung der Zelle beeinflusst wird (Gregory, Singh et al. 2003). Auch der Signalaustausch zwischen dem Wnt-Signalweg und anderen Wegen, wie dem TGF β -vermittelten oder dem Notch-Signalweg, trägt zur Regulierung der MSC Differenzierung bei. Ebenso kann der Wechsel vom kanonikalen zum nicht-kanonikalen Wnt-Signalweg die MSC von einem undifferenzierten Zustand hin zur osteogenen Differenzierung führen (Baksh, Boland et al. 2007).

P38 MAPK

P38 MAPK gehört zur Familie der MAPKs, zu der auch ERKs (*extracellular-signal-regulated kinases*) und JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) gehören (Raman, Chen et al. 2007). Vor allem p38 α ist essentiell für Differenzierungsprozesse von MSC. Allgemein reagiert p38 MAPK auf zellulären Stress oder Zytokine und kann dadurch viele zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration beeinflussen (Cuadrado and Nebreda 2010).

Der p38 MAPK-Signalweg wird in neueren Studien immer öfter in Zusammenhang mit Sox9 gebracht. Es muss allerdings erwähnt werden, dass es, wie in zahlreichen anderen zellulären Kontexten, auch im Bereich der mesenchymalen Stammzellen, widersprüchliche Beobachtungen bezüglich der Rolle

Einleitung

von p38 MAPK gibt. Dies liegt vermutlich an der Funktion von p38 MAPK als potentieller Entzündungsmediator und gleichzeitig Regulator der Differenzierung und Proliferation (Oeztuerk-Winder and Ventura 2012).

Die Rolle von p38 MAPK während der Knochenregeneration und Reparatur wurde unter anderem von Chang et al. erforscht (Chang, Sonoyama et al. 2007). Von Chondrozyten produzierte Zytokine aktivieren p38 MAPK in MSC, wodurch es zu einem wichtigen Mediator der Knochenbildung wird. Die p38 MAPK-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Runx2 reguliert dabei die Osteoblastendifferenzierung (Greenblatt, Shim et al. 2010), aber auch die Osteoklastenentstehung und Knochenresorption durch Entzündungssignale. Auch der Zeitpunkt der p38 MAPK-Aktivierung in MSC ist von entscheidender Bedeutung. Eine frühe Aktivierung von p38 MAPK in MSC regt die osteogene Differenzierung an, wohingegen eine späte Aktivierung zu Adipozytendifferenzierung führt. Dabei wurde gezeigt, dass p38 MAPK einen Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Adipogenese, nämlich C/EBP β , direkt phosphorylieren und somit aktivieren kann (Horie, Ishida et al. 2007).

Außerdem wurde p38 MAPK eine wichtige Rolle bei der Knorpelentwicklung und Aufrechterhaltung des permanenten Chondrozytenphänotyps zugeschrieben, da es für eine stabilisierte Sox9 mRNA verantwortlich zu sein scheint (Tew and Hardingham 2006). Eine konstitutive Aktivierung von p38 MAPK führt zu einer verzögerten Transition von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten sowie zum verzögerten Abschalten der Sox9 Expression (Zhang, Murakami et al. 2006). Abbildung 1.6 zeigt einen Überblick über die p38 MAPK Signalkaskade, welche durch Stresssignale aktiviert wird und anschließend, über Rezeptoren und verschiedene Kinasen, auf Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose Einfluss nehmen kann. Um die Differenzierung von MSC zu regulieren, kann jeweils der Mastertranskriptionsfaktor für die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung, nämlich C/EBP β , Runx2 oder Sox9, durch p38 MAPK reguliert werden. Der Aktivierungszeitpunkt und die Dauer spielen dabei eine entscheidende Rolle.

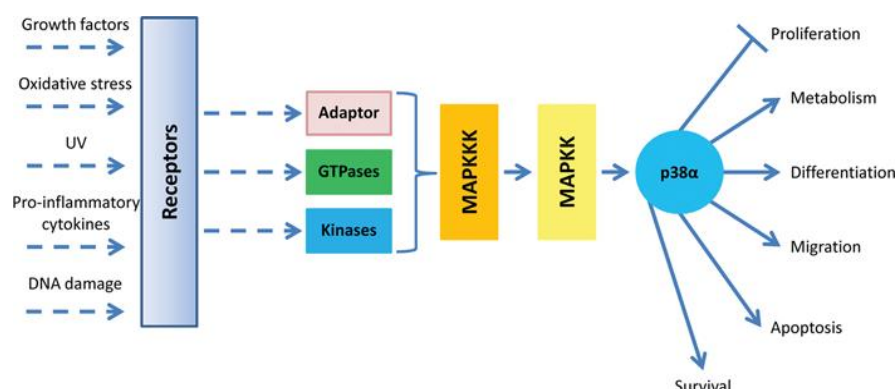


Abbildung 1.6 Stresssignale werden über Rezeptoren und verschiedene Kinasen an p38 α weitergeleitet, um eine Vielzahl von biologischen Zellfunktionen, wie Differenzierung, Apoptose oder Proliferation, zu steuern; Abbildung aus (Oeztuerk-Winder and Ventura 2012)

1.2.4 Zellzyklusregulierung in MSC

Die Regulierung des Zellzyklus nimmt in mesenchymalen Stammzellen, wie auch in Stammzellen im Allgemeinen, eine besondere Rolle ein, da die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung durch den Ein- beziehungsweise Austritt in/aus dem Zellzyklus gesteuert werden kann.

Der Zellzyklus bezeichnet allgemein den zyklischen Ablauf von Ereignissen, die letztendlich in einer Zellteilung resultieren. Dabei wechselt sich eine mitotische Phase der Zellteilung (M-Phase) mit der Interphase des Zellzyklus ab. In der Interphase finden das Wachstum der Zelle und die Verdopplung der DNA statt. Man unterteilt die Interphase in G1- (Gap 1), S- (Synthese) und G2- (Gap 2) Phase. Von der G1-Phase aus kann eine Zelle den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase, eine Ruhephase, übergehen. Die Zelle kann dann entweder differenzieren und somit die Proliferation einstellen oder zu einem späteren Zeitpunkt wieder in den Zellzyklus eintreten (Nasmyth 1996). Kontrolliert wird der korrekte Ablauf des Zellzyklus von Cyclinen, cyclin-abhängigen Kinasen (CDK=*cyclin-dependent kinase*) und deren Inhibitoren (CKI=*cyclin-dependent kinase inhibitor*).

CKIs werden in zwei unterschiedliche Familien unterteilt: INK4 und Cip/Kip. Zur Cip/Kip Familie gehören p21, p27 und p57, zur INK4 Familie p15, p16, p18 und p19 (Sherr and Roberts 1999). Die Regulierung von CDKs durch CKIs kann zum Beispiel durch Bildung eines Cyclin-CDK-CKI-Komplexes passieren. CIP/Kip Proteine können mit vielen verschiedenen Cyclin-CDKs Komplexe bilden, wie in Abbildung 1.8 gezeigt, und haben somit an verschiedenen Zeitpunkten die Möglichkeit den Zellzyklus zu regulieren. Die Mitglieder der INK4 Familie dagegen inhibieren speziell die Cyclin-CDK Aktivität während der G1-Phase (Abbildung 1.7) (Denicourt and Dowdy 2004).

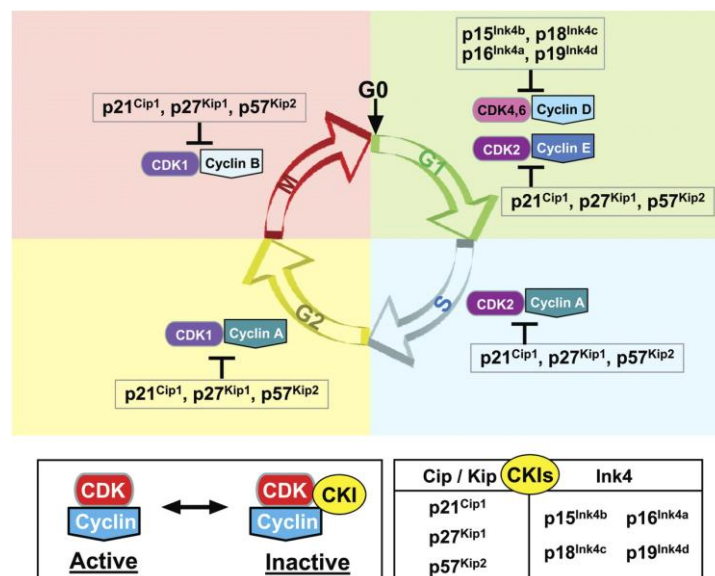


Abbildung 1.7 Regulierung des Zellzyklus. Verschiedene Cyclin-CDK (*cyclin-dependent kinase*)-Komplexe treiben den Zellzyklus an, während CKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) negativ auf das Fortschreiten des Zellzyklus wirken, indem sie die Cyclin-CDK-Komplexe inaktivieren. CKIs werden in zwei Familien unterteilt: die Cip/Kip und die INK4 Familie.

Abbildung aus (Fuster, Fernandez et al. 2010)

Einleitung

CIP/Kip Proteine wurden für lange Zeit ausschließlich als Kernproteine angesehen, mit der Funktion die Cyclin-CDK Aktivität zu inhibieren und somit den Zellzyklus negativ zu regulieren. Mittlerweile wird allerdings auch eine Funktion außerhalb des Kerns für die CKIs p21 und p27 angenommen, nämlich die Regulierung der Apoptose, wie Coqueret et al. berichten (Coqueret 2003).

Cycline sind kurzlebige Proteine, die zyklisch, in einem typischen Muster, während des Zellzyklus exprimiert werden, wie in Abbildung 1.8 gezeigt. Sie sind allerdings nur im Komplex mit CDKs in der Lage den Zellzyklus zu regulieren. Der Level an CDKs ist dabei relativ stabil im Verlauf des Zellzyklus, so dass die Cycline den limitierenden Faktor für die Komplexbildung darstellen. Dieser Komplex muss außerdem phosphoryliert werden, um aktiv zu sein und wiederum andere Proteine phosphorylieren zu können.

Cyclin D1 stellt ein klassisches G1-Cyclin dar, welches allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen während des gesamten Zellzyklus nachgewiesen werden kann. Ein Komplex aus Cyclin D1 und CDK4 oder 6 kann das Retinoblastom Protein (pRB), einen Inhibitor des Zellzyklus, phosphorylieren und somit inaktivieren. Dies führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und in der Folge zum Übertritt der Zelle von G1- in die S-Phase. Die Phosphorylierung von pRB passiert am sogenannten „G1-Kontrollpunkt“, wobei pRB oft als „Hüter“ dieser Kontrollstation beschrieben wird (Fu, Wang et al. 2004).

Es gibt verschiedene Kontrollpunkte in der Interphase, wie auch in der Mitosephase, an denen der Zellzyklus theoretisch gestoppt werden kann, wenn es beispielsweise zu fehlerhafter DNA Replikation in der Zelle gekommen ist.

Die Komplexität und Wichtigkeit der Zellzyklusregulierung für eine fehlerfreie Zellteilung wird seit Langem vor allem am Modellorganismus der Hefe erforscht. Die grundlegende Bedeutung dieser Forschung wurde 2001 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin honoriert, der an Leland Hartwell, Paul Nurse und Tim Hunt für die Entdeckung der Schlüsselregulatoren des Zellzyklus ging (Quelle: Nobelprize.org).

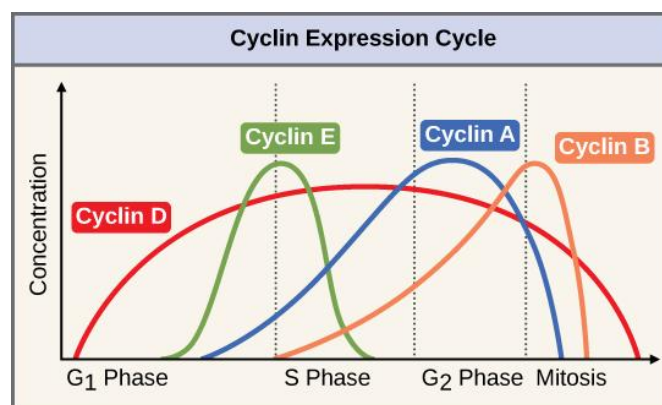


Abbildung 1.8 Zyklische Expression der verschiedenen Cycline im Verlauf des Zellzykluses.
(Abbildung modifiziert nach "WikiMiMa"/Wikimedia Commons)

1.3 *Tissue Engineering* am Beispiel der Knorpelreparatur

Das Potential von MSC, über die oben genannten molekularen Mechanismen in verschiedene Gewebetypen differenzieren zu können, macht sie für das Feld der künstlichen Gewebezucht äußerst attraktiv. Beim sogenannten *Tissue Engineering*, also der Gewebekonstruktion, handelt es sich noch um ein junges Forschungsfeld der regenerativen Medizin. 1993 definierte Langer und Vacanti *Tissue Engineering* als interdisziplinäres Feld zwischen Ingenieurwissenschaft und Biologie, mit dem Ziel zerstörtes oder krankes Gewebe bzw. Organe durch neue zu ersetzen oder zu regenerieren (Langer and Vacanti 1993). Dabei werden körpereigene Zellen, zusammen mit spezifischen Wachstumsfaktoren oder anderen stimulierenden Einflüssen (elektrischer/mechanischer Reiz) und Stützstrukturen (Scaffolds), kultiviert. Anders als bei der Reparatur von Gewebe, wie zum Beispiel durch Narbenbildung nach Verletzungen, setzt die regenerative Medizin auf das Ersetzen von zerstörtem oder verlorenem Gewebe durch identisches und gleichwertiges, neues Gewebe.

Neben komplettem Austausch von funktionsunfähigen Organen, wie man es im Allgemeinen durch allogene Transplantation macht, können heute auch neue Gewebestrukturen *in vitro* gezüchtet werden. Diese Art von Ersatzgewebekonstruktion wurde bereits in den verschiedensten Bereichen ausgetestet und angewandt, darunter war Hautgewebe, Knochen, Rückenmark, das periphere Nervensystem, Bindehaut, Herzklappen, urologische Gewebe sowie artikulärer Knorpel (zusammengefasst in (Horch, Kneser et al. 2012)). Ein Problem bei der Herstellung von Gewebeteilen ist dabei die ausreichende Vaskularisierung des Konstrukts. Diese Hürde muss für das *Tissue Engineering* im Bereich von Knorpelersatz zwar nicht überwunden, dafür aber eine Reihe anderer Schwierigkeiten gemeistert werden.

Es existieren drei verschiedene Knorpelarten im Körper: Der Faserknorpel, der zum Beispiel im Meniskus und den Bandscheiben zu finden ist, der elastische Knorpel, aus dem Ohrmuschel, Kehledeckel und Bronchien bestehen und der hyaline Knorpel, zu dem auch der artikuläre Knorpel gehört. Dieser ist in den diarthrodialen Gelenken, aber auch in der Luftröhre oder der Nase zu finden (Benjamin 1990). Vor allem diese Art von Knorpel ist durch die sich ständig erhöhende Anzahl von entzündlichen (rheumatoide Arthritis) oder degenerativen Gelenkerkrankungen (Osteoarthrose) in den Fokus der regenerativen Medizin gerückt.

Neben den klassischen Methoden des *Tissue Engineerings* im Bereich der regenerativen Medizin, wie zum Beispiel der autologen Chondrozyten Transplantation (ACT), ist es möglich Chondrozyten oder mesenchymale Stammzellen genetisch so zu verändern, dass die Expression verschiedener differenzierungsspezifischer Gene an- beziehungsweise abgeschaltet wird oder auch anabole Signalwege induziert und katabole Signalwege unterdrückt werden.

1996 war es Christopher Evans, der vorschlug genetisch veränderte Zellen zu benutzen, um Arthritis zu behandeln (Evans, Robbins et al. 1996). Er ließ dabei Synovialzellen *ex vivo* mittels retroviralen Vektoren transduzieren, um IL-1Ra (*interleukin-1 receptor antagonist*) zu exprimieren. Diese Zellen injizierte er in das Daumengrundgelenk von Arthritis-Patienten und konnte zeigen, dass IL-1Ra nicht nur exprimiert wurde, sondern auch biologisch aktiv war (Evans, Robbins et al. 2005). An dieser Stelle muss allerdings erwähnt werden, dass die Kommission Somatische Gentherapie des

Einleitung

Wissenschaftlichen Beirats der Bundesärztekammer in mehreren Grundsatzentscheidungen von individuellen Heilversuchen mit Gentransfer-Arzneimitteln abgeraten hat (Quelle: Entwicklung der Gentherapie, DFG). Somit ist ein zeitnahe Einsatz in Deutschland, vor allem im Bereich des muskuloskeletalen Systems, unwahrscheinlich und die Anwendung des *Tissue Engineerings* mit genetisch veränderten Zellen konzentriert sich hauptsächlich auf die USA und auf China.

2 Ziel der Arbeit

Sox9 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor der frühen Chondrogenese während der Gliedmaßenentwicklung und beeinflusst maßgeblich die embryonale Skeletogenese. In adulten Organismen wird Sox9 weiterhin vor allem in mesenchymalen Stammzellen (MSC) stark exprimiert, lässt sich aber auch in einzelnen anderen Geweben nachweisen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Rolle von Sox9 in adulten MSC für die Vitalität und das Wachstum der Zellen, die Differenzierungsentscheidung sowie für den Differenzierungsprozess zu gewinnen, und molekulare Signalkaskaden aufzuklären, in die Sox9 involviert ist.

Da adulte Stammzellen ein vielversprechendes und zukunftsweisendes *Tool* für die regenerative Medizin und das *Tissue Engineering* sind, ist es von zentraler Bedeutung deren Biologie, und den Einfluss einer bestimmten Expressionsänderung auf das Verhalten der Zellen, genau zu verstehen. Sox9 aktiviert die Transkription verschiedener Chondrogenese-assoziiierter Gene in MSC während der Embryogenese, ist aber auf der anderen Seite auch mit einigen Tumorerkrankungen in adulten Geweben assoziiert.

Daher ist es für die Grundlagenforschung im Bereich der adulten Stammzellen von großem Interesse, welche Folgen eine Fehlexpression von Sox9 für die Zellen mit sich bringt.

In der hier vorliegenden Arbeit soll mittels retrovirenen Vektoren die Sox9-Dosis in adulten MSC manipuliert werden, um folgende Fragen bezüglich des Transkriptionsfaktors beantworten zu können:

1. Zeigen Zellen mit einer verringerten oder erhöhten Sox9-Dosis Veränderungen metabolischer Eigenschaften wie Proliferation oder Apoptose?
2. Welche Proteine sind an diesen Veränderungen beteiligt?
3. Welche Gene werden in ihrer Transkription durch die Änderung der Sox9-Dosis beeinflusst?
4. Über welche Signalwege wirkt Sox9 auf diese Gene beziehungsweise auf die zugehörigen Proteine?
5. Beeinflusst der Sox9-Level die Differenzierungsentscheidung oder den Verlauf der Differenzierung von MSC und wenn ja, wie?
6. Sind die Sox9-vermittelten Effekte in MSC unabhängig von deren Ursprungsgewebe oder gewebespezifisch?

Diese Arbeit will dazu beizutragen, dass das Potential von MSC, durch die Aufklärung grundlegender molekularer Mechanismen und Signalwege im Zusammenhang mit der Sox9 Expression, genauer verstanden werden kann, um eine theoretisch denkbare Anwendung von MSC in der Zukunft, im Bereich der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineerings*, möglich werden zu lassen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe

Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden aus dem Knochenmark (BMSC) (Ahmed, Vogel et al. 2006) und aus dem subkutanen Fettgewebe (ASC) (Bunnell, Flaas et al. 2008) fünf Wochen alter, männlicher CD-Ratten isoliert und kultiviert.

Dabei wurde das Knochenmark aus Tibia und Femur durch 3-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm gewonnen, homogenisiert und in Proliferationsmedium, bestehend aus α -MEM (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) mit 2 % Glutamax (Life Technologies, Carlsbad, USA), 1 % Pen/Strep (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und 10 % FKS (Life Technologies, Carlsbad, USA), kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden nach drei Tagen entfernt, die CFU-Zellen (*colony forming units*) bis 70 – 80 % Konfluenz expandiert und anschließend für spätere Versuche mit 10 % DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Für die Isolierung von MSC aus Fettgewebe wurde das subkutane Fett der rechten und linken Leiste von CD-Ratten entfernt, zerkleinert und enzymatisch mit Collagenase D (Roche, Penzberg, Deutschland) für 30 - 45 Minuten bei 37°C verdaut. Nach Homogenisieren und Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen in Proliferationsmedium, bestehend aus DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) mit 1 % Pen/Strep und 10 % FKS, kultiviert. Nach drei Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Die adhärenenten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 – 80 % expandiert und anschließend ebenfalls für spätere Experimente mit 10 % DMSO eingefroren.

3.1.2 Differenzierung

3.1.2.1 Osteogenese

Für die osteogene Differenzierung wurden je 200.000 MSC pro Well in einer 6-Well-Platte (Corning, Corning, USA) ausgesät und für bis zu 21 Tage in osteogenem Medium, bestehend aus α -MEM high glucose (Life Technologies, Carlsbad, USA) mit 10 % FKS, 1 % Pen/Strep, 10 nM Dexamethason (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 50 μ g/ml Ascorbat-2-Phosphat (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und 10 mM β -Glycerophosphat (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), kultiviert.

3.1.2.2 Chondrogenese

Je 200.000 MSC wurden in 200 μ l chondrogenem Differenzierungsmedium, bestehend aus α -MEM high glucose mit ITS+ *premix* (6,25 μ g/ml Insulin, 6,25 ng/ml Selensäure, 6,25 μ g/ml Transferrin,

1,25 mg/ml BSA und 5,35 µg/ml Linolsäure) (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA.), 110 µg/ml Pyruvat (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 40 µg/ml Prolin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 0,1 µM Dexamethason, 50 µg/ml Ascorbat-2-Phosphat und 10 ng/ml TGFβ-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA), aufgenommen (Johnstone, Hering et al. 1998) und in einer 96-Well Platte mit V-förmigem Boden für 10 Minuten bei 1000 rpm pelletiert, um eine 3D-Kultur der Zellen zu erzeugen. Nach einem Tag wurden je drei bis vier Aggregate in ein Well einer 48-Well Platte (Corning, Corning, USA) umgesetzt und zusammen kultiviert. Für eine Kulturzeit von 28 Tagen wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Um Hypertrophie zu induzieren, wurde für die letzten 14 Tage Kultivierungszeit das chondrogene Differenzierungsmedium durch hypertrophes Differenzierungsmedium, bestehend aus α-MEM high glucose mit ITS+ *premix*, 110 µg/ml Pyruvat, 40 µg/ml Prolin und 1 nM Triiodothyronin (T3) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), ersetzt.

3.1.2.3 Adipogenese

Die adipogene Differenzierung wurde für maximal 21 Tage durchgeführt. 200.000 Zellen wurden dabei in je ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät und mit adipogenem Differenzierungsmedium, bestehend aus DMEM-F12 mit 10 % FKS, 1% Pen/Strep, 1 µM Dexamethason, 1 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), kultiviert.

3.1.3 Transfektion von EcoPack2-293 Zellen und Generierung von retroviralen Partikeln

Die Verpackungszelllinie EcoPack2-293 (Clontech, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) wurde in DMEM-F12 Medium mit 10 % FKS, 1 % Pen/Strep, 1 mM Pyruvat und 2 % Glutamax bis zu einer Konfluenz von 80 % in 6-Well-Platten kultiviert.

Drei verschiedene Sox9-spezifische shRNA Sequenzen, beziehungsweise die Ratten Sox9 (*rSox9*) cDNA-Sequenz (siehe Tabelle 4), wurden in retrovirale Expressionsvektoren kloniert (siehe 3.2.1) und diese dann in die EcoPack2-293 Zelllinie mittels Lipofectamine2000 (Life Technologies, Carlsbad, USA) gemäß Herstelleranweisung transfiziert. 48 Stunden später wurde dem Zellkulturmedium 2 µg/ml Puromycin (Enzo Lifescience, Farmingdale, USA) zugesetzt. Neun bis 14 Tage später konnten gut sichtbare Einzelklone gepickt und in 6-Well-Platten überführt, kultiviert und anschließend in T-75 und danach in T-175 Zellkulturflaschen passagiert werden. Für Langzeitlagerung wurde ein Teil der Zellen mit 10 % DMSO eingefroren.

Der Mediumüberstand der transfizierten EcoPack2-293 Klone enthält die retroviralen Partikel, die entweder eine Sox9 shRNA oder die *rSox9* cDNA Sequenz tragen. Der Virustiter wurde nach Herstellerangaben bestimmt und 10⁵ CFU für die virale Transduktion benutzt. Für Knockdown Versuche wurde nach Austestung ausschließlich die shSox9 Nr.2 benutzt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Sequenzen der verschiedenen Sox9 shRNAs und des Ratten Sox9 Gens (rSox9)

shSox9 Nr.1	<u>Oberer Strang:</u> 5'-gatccGGAGGAAGTCGGTGAAGAATGTTCAAGAGACATTCTTCACCGACTTCCTC CTTTTTACGCGTg-3'
	<u>Unterer Strang:</u> 5'-aattcACGCGTAAAAAGGAGGAAGTCGGTGAAGAATGTCTCTTGAACATTCTT CACCGACTTCCTCCg-3'
shSox9 Nr.2	<u>Oberer Strang:</u> 5'-gatccGCTGGTAGTCCCGTTGATATTCAAGAGATATCAACGGGACTACCAGCTTT TTTACGCGTg-3'
	<u>Unterer Strang:</u> 5'-aattcACGCGTAAAAAGCTGGTAGTCCCGTTGATATCTCTTGAATATCAAC GGGACTACCAGCg-3'
shSox9 Nr.3	<u>Oberer Strang:</u> 5'- gatccGCGGCTCCAGCAAGAACAAGTTCAAGAGACTTGTTCTTGCTGGAGCC GTTTTTTACGCGTg-3'
	<u>Unterer Strang:</u> 5'-aattcACGCGTAAAAACGGCTCCAGCAAGAACAAGTCTCTTGAACCTTGTTT TTGCTGGAGCCCGCg-3'
rSox9 (5'→3')	CACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGTACCGTCGACATGAAGTCACT CCCTCCCACCTCCTCCAGGCGCCTCCCCCACCTGATGGAGCCCTGTGTCTAAGAAGAGACTC TGGGCTGGGAGCCGGAGAGCTGAGAGCGTTGCTCGGAACTGTCTGGAACTTCAGTGGGAGC GACAACTTTACCAGTTTCGGTCCAGGAACTTTCTTTGCAAAAGAGACGGGGTGCAAGTAGCCC TGGTTTCGTTCTCTGTTTTCCCTCCCTCCTCCTCCGCTCCGATTGCGCTTCCCCGGGTTTGGAG CGGGCAACTGAGCACTGGCCACCCAGCGCCTCTGCTAAGTGCTCGCCGCCGAGCCGGGTGA CGCGCCAACCTCCCCGGGAGCCGTTTCGCTCGGCGTCCGCGTCCGGGCAGCTGAGGGAAGAG GAGCCCCAGCAGCCGCGGCTTCTCTCCTTTCCCGGCCACCCGCCCCCTGCCCCGGGCTCGCG TATGAATCTCCTGGACCCCTTCATGAAGATGACCGACGAGCAGGAGAAGGGCTTGTCTGGCGC CCCCAGCCCCACCATGTCTGGAGGACTCGGCTGGTTGCCCCCTGCCCCCTCGGGCTCAGGCTCCG ACACGGAGAACACACGGCCCCAGGAGAACACGTTCCCCAAGGGCGAGCCGGATCTGAAGAAG GAGAGCGAGGAAGATAAATCCCAGTGTGCATCCGCGAGGCGGTCAGCCAGGTGCTGAAGGG CTACGACTGGACCCTGGTGCCCATGCCGGTGCGCGTCAACGGCTCCAGCAAGAACAAGCCACA CGTCAAGCGGCCCATGAACGCCTTCATGGTGTGGGCGCAGGCTGCGCGCAGGAAGCTGGCAG ACAGTACCCGCATCTGCACAACGCGGAGCTCAGCAAGACTCTGGGCAAGCTCTGGAGGTGAG GATCCCTGGGCCTCATGGGCCTTCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG

3.1.4 Transiente Transfektion von MSC mit siRNA

Eine CCND1 (Cyclin D1) siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool Ccnd1 siRNA, Dharmacon, Lafayette, USA) wurde benutzt, um einen transienten *Knockdown* von Cyclin D1 in –SOX9 und Kontrollzellen zu generieren. Als Kontrolle für die siRNA-Transfektionsexperimente wurde eine *non-target* siRNA (*nt* siRNA) (Dharmacon, Lafayette, USA) verwendet.

24 Stunden vor der transienten siRNA-Transfektion wurden 100.000 Zellen in 6-Well-Platten in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels Dharmafect (Dharmacon, Lafayette, USA) mit 5 nM CCND1 siRNA, beziehungsweise Kontroll-siRNA, transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde der mRNA-*Knockdown* mithilfe von qPCR (siehe 3.2.2.2.), und nach drei bis vier Tagen der Protein-*Knockdown* mithilfe von Western Blot Analysen (siehe 3.2.3.2), untersucht.

3.1.5 Transduktion von MSC mit Retroviren

100.000 MSC wurden in einer T-75 Zellkulturflasche ausgesät und für 24 Stunden in entsprechendem Proliferationsmedium (siehe 3.1.1) kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurde 6 ml Virus-haltigem Mediumüberstand der transfizierten EcoPack2-293 Zellen mit 6 ml Proliferationsmedium inklusive 6 µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) vermischt und zu den MSC gegeben. Der Mediumüberstand enthält Viruspartikel, die innerhalb von 24 Stunden produziert wurden und wird vor der Transduktion mit 0,45 µm Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert, um eine EcoPack2-293 Kontamination auszuschließen. An drei hintereinander folgenden Tagen wurden die MSC auf diese Weise transduziert, für weitere drei Tage mit Proliferationsmedium kultiviert und anschließend für zwei bis drei Wochen mit 2,5 µg/ml Puromycin selektioniert.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Klonierung verwendeter Plasmide

Die DNA Sequenz des Ratten Sox9 (*rSox9*) Gens (siehe Tabelle 4) wurde synthetisiert und über zwei SfiI-Klonierungsschnittstellen in einen pMA-RQ-Vektor kloniert (durchgeführt von Geneart, Regensburg, Deutschland). Dieser wurde als 1057204_rSox9-pMA-RQ bezeichnet und in *One Shot*[®] TOP10 chemisch kompetente *E.coli* Zellen (Life Technologies, Carlsbad, USA) transformiert (siehe 3.2.1.4), Einzelklone gepickt und in flüssigen LB (*lysogeny broth*)-Kulturen vermehrt. Anschließend wurde das Plasmid isoliert und aufgereinigt (siehe 3.2.1.1). Aus diesem Plasmid wurde das Sox9-Fragment mittels Restriktionsenzyme ausgeschnitten (siehe 3.2.1.2) und in den retroviralen Vektor pRetroQ-AcGFP1-C1 (Clontech, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) (siehe Abb.3.1) ligiert (siehe 3.2.1.3).

Analog dazu wurden die Sox9 shRNA Fragmente in den retroviralen Vektor (RNAi-Ready pSIREN-RetroQ) kloniert (bereits beschrieben von N. Ahmed in *Influencing CHONDROGENESIS in bone marrow STROMAL CELLS*, 2006).

Das LB Medium wurde wie folgt angesetzt:

10 g Bacto-Trypton (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)

5 g Yeast-Extract (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)

10 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Auf 1 Liter H₂O auffüllen, pH 7 einstellen und autoklavieren.

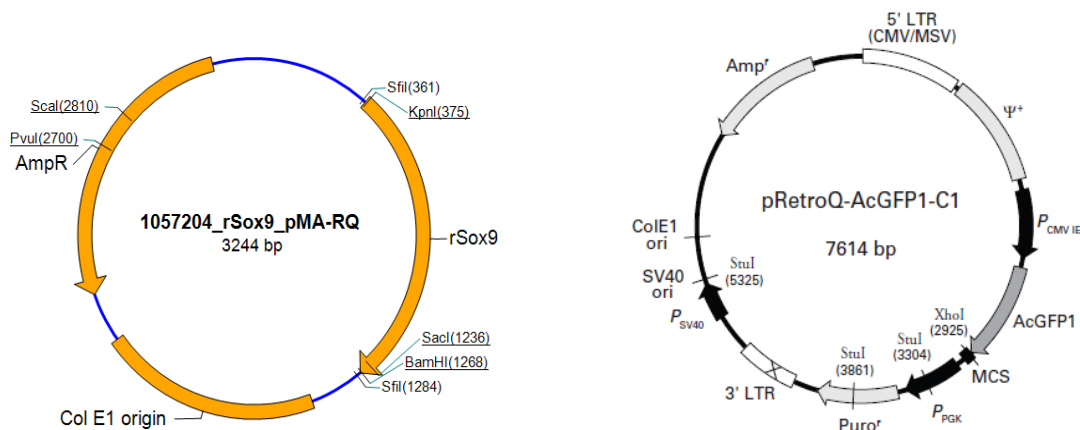


Abbildung 3.1 Vektorkarten von 1057204_rSox9_pMA-RQ und pRetroQ-AcGFP1-C1. Die Ratten Sox9 cDNA (hergestellt von Geneart, Regensburg, Deutschland) wurde aus 1057204_rSox9_pMA-RQ über Sall und BamHI Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in die *multiple cloning site* (MCS) des retroviralen Vektor pRetroQ-AcGFP1-C1 kloniert, um in MSC transduziert werden zu können.

3.2.1.1 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde mithilfe von kommerziell erhältlichen *Kits* gemäß Herstelleranleitung isoliert und aufgereinigt. Der „*Spin Miniprep Kit*“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde für Bakterienkulturen bis 5 ml und der „*Midiprep Kit*“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) für Kulturen bis 50 ml verwendet. Plasmide für das retrovirale Transduktionssystem wurden mit einem speziellen Endotoxin-freien *Kit* (*NucleoBond Plasmid Maxi EF Kit*, Clontech, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) isoliert.

3.2.1.2 Restriktion mittels Enzymen

Über eine Sall und BamHI Schnittstelle wurde das rSox9-Fragment in den retroviralen Überexpressionsvektor pRetroQ-AcGFP1-C1 (Clontech, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) kloniert.

Restriktionsansätze:

	1057204_rSox9-pMA-RQ	pRetroQ-AcGFP1-C1
Sall (NEB, Ipswitch, USA)	1 Unit (0,5 µl)	1 Unit (0,5 µl)
BamHI (NEB, Ipswitch, USA)	1 Unit (0,5 µl)	1 Unit (0,5 µl)
CIP (<i>calf-intestinal-phosphatase</i>) (NEB, Ipswitch, USA)	--	5 Units (0,5 µl)
H ₂ O	5 µl	12,5 µl
NEB3 Puffer (NEB, Ipswitch, USA)	2 µl	2 µl
BSA 10x (NEB, Ipswitch, USA)	2 µl	2 µl
Plasmid DNA	1 µg (10 µl)	1 µg (2 µl)
Gesamtansatz	20 µl	20 µl

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (3.2.1.5). Das *rSox9*-Fragment (903 bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Der linearisierte pRetroQ-AcGFP1-C1 Vektor wurde nach der Restriktion mittels einem „*QIAquick PCR-Purification Kit*“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

3.2.1.3 Ligation

Für die Ligation wurde Insert und linearisierter Vektor im molaren Verhältnis 5:1 eingesetzt und über Nacht bei 4°C wie folgt ligiert:

rSOX9 Fragment	29,65 ng (5,4 µl)
T4 Ligase Puffer (NEB, Ipswitch, USA)	1 µl
pRetroQ-AcGFP1-C1 linearisiert	50 ng (1,3 µl)
H ₂ O	1,3 µl
T4 Ligase (NEB, Ipswitch, USA)	400 Units (1 µl)
Gesamt	10 µl

Die Menge an Insert-DNA wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{5 \times \text{Vektormenge}[\text{ng}] \times \text{Insertlänge}[\text{bp}]}{\text{Vektorlänge}[\text{bp}]}$$

$$\frac{5 \times 50\text{ng} \times 903\text{bp}}{7614\text{bp}} \equiv 29,65\text{ng}$$

3.2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in One Shot® TOP10 chemisch kompetente E.coli Zellen

One Shot® TOP10 chemisch kompetente *E.coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und gemäß Herstelleranweisung mit maximal 100 ng DNA transformiert. Die DNA und die *One Shot® TOP10* chemisch kompetenten *E.coli* Zellen wurden anschließend zusammen pipettiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert, 30 Sekunden auf 42°C erhitzt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und in 250 µl vorgewärmten S.O.C. Medium (Life Technologies, Carlsbad, USA) aufgenommen. Das S.O.C Medium mit den *E.coli* Zellen wurde eine Stunde bei 37°C horizontal geschüttelt und anschließend wurde zwischen 20 und 200 µl des Transformationsansatzes auf LB Platten, inklusive Ampicillin, ausplattiert. Die LB_{Amp} Platten wurden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert, um am nächsten Tag Einzelkolonien zu picken.

LB_{Amp}-Platten wurden wie folgt hergestellt:

- 10 g Bacto-Trypton (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)
- 5 g Yeast-Extract (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)
- 10 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 15 g Bottom Agar (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)

Material und Methoden

Auf 1 Liter H₂O auffüllen, pH 7 einstellen und autoklavieren. Nach abkühlen auf unter 60°C Ampicillin (100µg/ml) zugeben, in Petrischalen gießen und trocknen lassen.

3.2.1.5 Agarosegel Elektrophorese

Um DNA aufzutrennen, wird eine adäquate Menge mit Ladepuffer (6x *Agarose gel loading dye*) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt und ein 1 bis 1,5 %-iges (w/v) Agarosegel (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) damit beladen. Der Agaroseanteil und somit die Porengröße des Gels variieren dabei gemäß der Größe der DNA. TAE (**T**ris-**A**cetate-**E**DTA) Puffer wird als Elektrophoresepuffer verwendet und 20 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) wird als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Die Elektrophorese findet bei 90 V für 45 bis 90 Minuten statt und die mit Ethidiumbromid angefärbte DNA konnte anschließend im Gel auf einem Chemi-Imager (Intas UV System, Göttingen, Deutschland) visualisiert werden.

Standardmäßig wurde etwa die Hälfte eines 10 µl Ligationsansatzes (ca. 40 ng) aufgetragen.

Als Größenstandard diente eine entsprechende DNA Leiter (Gene Ruler, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

TAE-Puffer:

0,8 mM Tris-Base,

0,8 mM Essigsäure,

0,04 mM EDTA,

pH 7,8

3.2.2 RNA Isolierung aus MSC

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde je nach eingesetzter Zellzahl mit Hilfe des „*Absolutly RNA Miniprep Kit*“ oder des „*Absolutly RNA Nano Miniprep Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde ein Zellpellet (Lagerung bei -20°C möglich) durch Zugabe eines β-Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffers homogenisiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an 80 % Sulfolane versetzt. Dadurch kann die isolierte RNA an ein Glasfaser-Substrat-Säulchen gebunden werden. Es folgen ein optionaler DNase-Verdau, Waschschrte mit einem Hoch-Salz-Puffer und anschließend mit einem Niedrig-Salz-Puffer und die Elution der RNA in 10 µl (Nanoprep), beziehungsweise 30 bis 100 µl (Miniprep), eines auf 60°C erwärmten Elutionspuffers. Die RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert beziehungsweise nach Konzentrationsbestimmung und Qualitätsprüfung zu cDNA umgeschrieben (3.2.2.1).

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung, Qualitätsprüfung und cDNA Synthese

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte gemäß Herstelleranleitung mit Hilfe eines Picodrops (Pico100, Picodrop, Hinxton, Großbritannien).

Die RNA-Qualität und Integrität wurde anschließend mittels eines *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) überprüft. Dabei wird anhand einer Kapillar-Gelelektrophorese die RNA der Größe nach aufgetrennt. So kann rRNA (5S, 18S, 28S), mRNA, sowie degradierte RNA voneinander getrennt und visualisiert werden. Anhand der RIN (*RNA Integrity Number*) kann ein Rückschluss auf die Integrität und die Qualität der RNA gezogen werden. Ein RIN-Wert von 10 steht dabei für eine komplett intakte und ein Wert von 1 für eine komplett degradierte RNA.

Um einzelsträngige cDNA aus isolierter RNA herzustellen, wurde der „*AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) laut Herstelleranleitung benutzt.

Der Reaktionsansatz für 0,3 µg bis 3 µg RNA wurde wie folgt pipettiert:

10 µl „*First strand master mix*“ (2x)

3 µl Oligo(dT) oder *Random Primer*

1 µl *AffinityScript RT/ RNase Block enzyme mixture*

X µl Total RNA (maximal 3 µg)

Mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl auffüllen

Anschließend wurde der Mix für fünf Minuten bei 25°C inkubiert, um eine Primer-Anlagerung zu ermöglichen. Bei 42°C für 15 Minuten erfolgte dann die cDNA-Synthese und mit einer fünf-minütigen Inkubation bei 95°C wurde die Synthese schließlich beendet. Die so synthetisierte cDNA wurde für kurzzeitige Lagerung bei 4°C und für Langzeitlagerung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Quantitative real-time PCR

Die Expression verschiedener Gene wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) untersucht. Dazu wurde das *Mx3005P QPCR* System von Agilent Technologies benutzt.

Für *Sox9* wurde die absolute cDNA Kopienzahl pro 100 µg RNA an Hand einer Standardkurve bestimmt. Dazu wurde ein Plasmid, welches die PCR Amplikonsequenz von *Sox9* enthält, seriell verdünnt, um eine absolute Quantifizierung zwischen 50 und 500.000 *Sox9* cDNA Kopien verifizieren zu können. Die anderen Gene wurden auf ihre relative Expression, bezogen auf die Kontrolle (Calibrator), untersucht und auf mindestens ein, maximal drei Haushaltsgene, normiert.

Für die PCR-Ansätze wurden jeweils zu 1 nM spezifischer Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) (siehe Tabelle 5) der *BrilliantR II SYBR Green QPCR Master Mix* (Stratagene, La Jolla, USA) gegeben und für 10 Minuten bei 95 °C einmalig initial denaturiert. Anschließend folgten 40

Material und Methoden

Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 Sekunden, einem Annealingschritt bei 60°C für 60 Sekunden und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 60 Sekunden.

Der Reaktionsansatz von je 25 µl wurde folgendermaßen hergestellt:

Primer	je 0,5 µl
SYBR-Green	12,5 µl
Rox-Referenz-Dye	0,375 µl
cDNA	5 µl
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen
Gesamt	25 µl

Die Proben wurden in eine 96-Well-PCR-Platte (Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland) als Triplikate aufgetragen und anschließend mit Hilfe der *MxPro QPCR Software für Mx3000P* und *Mx3005P QPCR* Systeme (Stratagene, La Jolla, USA) analysiert.

Tabelle 4 Liste der Primer, die für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verwendet wurden

Gen	Primer-Sequenz (5' → 3')	Amplikon-Länge [bp]	Tm [°C]	NCBI Referenz Nummer:
<i>Alp</i> (Alkalische Phosphatase)	fwd: GACAAGAAGCCCTTCACAGC rev: ACTGGGCCTGGTAGTTGTTG	118	59,4 59,4	NM_013059.1
<i>β-actin</i> (Beta actin)	fwd: GTA GCC ATC CAG GCT GTG TT rev: CCC TCA TAG ATG GGC ACA GT	104	60 59	NM_031144
<i>Bcl-2</i>	fwd: GGGAGCGTCAACAGGGAGATG rev: GACAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG	169	63,7 63	NM_016993.1
<i>Cbfa1</i> (Runx2)	fwd: GGCCGGGAATGATGAGAACTA rev: AGATCGTTGAACCTGGCCACT	233	60 60	XM_346016
<i>Ccnd1</i> (Cyclin D1)	fwd: GGAGTGTGGTGGCCGCGATG rev: ACGTCGGTGGGTGTGCAAGC	253	65,5 63,5	NM_171992.4
<i>Col1a1</i> (Kollagen1a1)	fwd: TCCAGGGCTCCAACGAGA rev: GCTGTAGGTGAATCGACTGTTGC	59	59 60	Z78279
<i>Col2a1</i> (Kollagen2a1)	fwd: AGCCAATGGCGAGCCTGGCA rev: TCACCCCGGGGACCAACGAG	273	63,5 65,5	L48440
<i>Col10a1</i> (Kollagen10a1)	fwd: CCC TAT TGG ACC ACC AGG TA rev: TCT CTG TCC GCT CTT TGT GA	247	59 59	AJ131848
<i>Ctnnb1</i> (beta-catenin1)	fwd: TGCGCCTTTGCGGGAACAGG rev: ATGCGGACGCCCTCCACGAA	126	63,5 63,5	NM_053357.2
<i>Dlx3</i>	fwd: CGTTTCCAGAAAGCCCAGTA rev: CCCGGGAGGGGGTCACTCTC	173	65,5 67,6	XM_575377.4
<i>Dlx5</i>	fwd: CTGGCCGCTTTACAGAGAAG rev: CTGGTGACTGTGGCGAGTTA	220	59,4 59,4	NM_012943.1
<i>GAPDH</i>	fwd: CAC AGT CAA GGC TGA GAA TGG G rev: TTG GTG GTG CAG GAT GCA TTG C	290	62,8 69	X02231 NM_017008.3
<i>Itga11</i> (Integrin alpha 11)	fwd: AACTTCCAGCTCCTGGACAC rev: CTCAGCACCTGTTGGCAGTA	236	59,4 59,4	NM_001108156.1
<i>Mapk14</i> (p38)	fwd: ATGACGAAATGACCGGCTAC rev: ACAACGTTCTTCCGGTCAAC	141	57,3 57,3	NM_031020
<i>Mmp13</i>	fwd: ACCTGGGATTTCCAAAAGAGG rev: ACACGTGGTTCCCTGAGAAGA	93	58 58	NM_133530.1
<i>Msx2</i>	fwd: CCTCGGTCAAGTCGGAAAAT rev: ACTGTTTCTGGCGGAACCTTG	192	57,3 57,3	NM_012982.3
<i>Osteocalcin</i>	fwd: CATGAGGACCCTCTCTCTGC rev: TGGACATGAAGGCTTTGTCA	190	58,4 58,6	NM_013414.1
<i>p21</i>	fwd: AGCAAAGTATGCCGTCGTCT rev: ACACGCTCCAGACGTAGTT	161	57,3 59,4	BC100620
<i>Sox5</i>	fwd: GAGCAGATCGCAAGGCA rev: CGGGAGGGAACACGGGAATC	120	61,8 63,5	XM_342784.3
<i>Sox9</i>	fwd: CTG AAG GGC TAC GAC TGG AC rev: TAC TGG TCT GCC AGC TTC CT	140	59 60	XM_343981

<i>Vegfa</i>	fwd: TGGCTTTACTGCTGTACCTCCA	71	59	NM_031836
	rev: TTTCTGCTCCCCTTCTGTCGT		60	
<i>C/EBPβ</i>	fwd: CAAGCTGAGCGACGAGTACA	156	59,4	NM_024125.4
	rev: AGCTGCTCCACCTTCTTCTG		59,4	
<i>Itga10</i> (<i>Integrin alpha 10</i>)	fwd: TTT CTT CGG GAA ATC AGA GC	188	57,9	NM_001108156.1
	rev: TGG ATG GAG AAG CCA ATC TC		58,6	
<i>N-cadherin</i>	fwd: CCAGCCTGACTGAGGAGCCGA	181	65,7	NM_031333.1
	rev: GACCTGATTCTGACAAGCTCTTGCG		64,6	
<i>COMP</i>	fwd: TGA CTT CGA TGC TGA CAA GG	167	60	NM_012834
	rev: GAA CGA TCT CCA TTC CCT GA		60	
<i>Aggrecan</i>	fwd: ACAAGGACAGCAGCCCCGGA	186	63,5	NM_022190.1
	rev: GGCCAGTGGAGGCCAGGGTA		65,5	
<i>18s</i>	fwd: AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	199	57,3	V01270
	rev: CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA		57,3	
<i>p300</i>	fwd: ACGCATTGTCCATGACTACAAG	151	58,4	XM_576312.4
	rev: CCTCTCTTCCTCTTCTGTTCA		60,3	
<i>Pparγ</i>	fwd: GGTGAACTCTGGGAGATCCT	110	59,8	NM_013124.3
	rev: AATGGCATCTCTCTGTCAACC		57,9	
<i>SREBF1</i>	fwd: ACAAGATTGTGGAGCTCAAGG	72	57,9	AF286470.2
	rev: TGC GCAAGACAGCAGATTTA		55,3	
<i>FASN</i>	fwd: GTGGAAGACACTGGCTCGAA	195	59,4	NM_017332.1
	rev: TGGTACACTTTCCCGCTCAC		59,4	
<i>LPL</i>	fwd: CAGAGAAGGGGCTTGAGA	89	58,8	NM_012598.2
	rev: TTCATTACAGCAGGGAGTCAA		55,3	

3.2.2.3 PCR-basierte Microarray Analyse

Mit einer PCR-basierten *Microarray* (SABiosciences, Qiagen, Hilden, Deutschland) Analyse wurde die Expression von 84 Zellzyklus-assoziierten Genen untersucht. Dabei wurde RNA isoliert (siehe 3.2.2.), in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.2.1) und zusammen mit einem *SYBR-Green PCR Master Mix* in die 96-Well Array Platte pipettiert. Jedes Well enthält dabei ein spezifisches Primerpaar. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines vom Hersteller zur Verfügung gestellten kostenlosen Softwareprogramms (SABiosciences, RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis).

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Proteinisolation aus MSC

Um Proteine aus *in vitro* kultivierten MSC zu isolieren, wurden diese einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) abgelöst und bei 1200 rpm pelletiert. Das entstandene Pellet wurde erneut mit PBS gewaschen und mit RIPA Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) lysiert. Der RIPA-Puffer wurde kurz zuvor mit einem Protease- (Complete Mini, Roche, Penzberg, Deutschland) und/oder Phosphataseinhibitor (PhosphoSTOP, Roche, Penzberg, Deutschland) versetzt. Anschließend wurde das Lysat bei 13000 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand mit den löslichen Gesamtproteinen in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Proteinkonzentration wurde mittels eines *BCA-Kits* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt, der auf der Biuret-Reaktion beruht. Dabei wird Cu^{++} , unter alkalischen Bedingungen, zu Cu^+ reduziert und bildet dann, zusammen mit Bicinchoninsäure (BCA), einen violetten Farbkomplex. Das Absorptionsmaximum für diesen Farbstoff liegt bei 562 nm und kann spektralphotometrisch analysiert werden.

Als Proteinstandard diente Bovines Serum Albumin (BSA), welches mit Wasser zu einer seriellen Standardreihe verdünnt (0 - 2000 µg/ml) wurde. 10 µl jedes Standards, beziehungsweise jeder zu messenden Probe, wurden in 200 µl BCA-Arbeitslösung pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es erfolgte jeweils mindestens eine Doppelbestimmung. Die Absorption jeder Probe, beziehungsweise jedes Standards, wurde anschließend in einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Deutschland) bei 560 nm gemessen und anhand einer linearen Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration in ng/µl bestimmt.

3.3.3 Western Blot Analyse

25-50 µg des Gesamtproteins (abhängig von der Expression des Zielproteins) wurden mit einem SDS-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und auf ein 10-12 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe bei 80 bis 100 V für zwei bis drei Stunden werden die Proteine entweder auf eine Nitrozellulose- (Bio-Rad, Hercules, USA) oder PVDF-Membran (Roche, Penzberg, Deutschland) geblottet. Dies erfolgte bei 30V für 16 Stunden. Anschließend wurde die Membran in entweder 5 % Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder 5 % BSA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), gelöst in TBS-T, für eine Stunde blockiert und mit dem ersten Antikörper entweder bei 4°C für 16 Stunden oder bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit dem entsprechenden zweiten HRP-gekoppelten Antikörper (Santa Cruz, Dallas, USA; Jackson Immuno Research, West Grove, USA) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe eines ECL-Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und eines Röntgenfilmentwicklers (Agfa Healthcare, Curix60, Greenville, USA) detektiert.

5-fach SDS-Ladepuffer:

0,5 % Tris/HCl pH 6,8

10 % SDS

0,25 M DTT

10 % Glycerin

0,05 % Bromphenolblau; in H_2O lösen

Tabelle 5 Antikörper, die für Western Blot Analysen verwendet wurden

Antikörper (Nomenklatur)	Antigen	Spezifität	Ig	Verdünnung für WB	Quelle (Hersteller)
Kaninchen anti-Sox9 (AB5535)	Sox9	H,m,r	polyklonal	1:1000	Abcam
Maus anti-p21 (SX118)	p21	H,m,r	monoklonal	1:500	BD Bioscience
Maus anti-Cyclin D1 (G124-326)	Cyclin D1	H, m	monoklonal	1:500	BD Bioscience
Kaninchen anti-CDK4 (Poly6333)	CDK4	H,m,r	polyklonal	1:200	BioLegend
Ziege anti-Akt1 (C-20) sc-1618	Akt1,2,3	H,m,r	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-phospho-Akt1/2/3 (Ser473)	Phospho-Akt1/2/3	H,m,r	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti-GSK3 beta [G8] (ab2602)	GSK3β	H, r	monoklonal	1:1000	Abcam
Kaninchen anti-phospho-GSK3 beta (Ser9)	Phospho-GSK3β	H, m, r, Mk	monoklonal	1:1000	Cell signalling
Maus anti-beta-catenin (14/Beta-Catenin)	β-catenin	H	monoklonal	1:1000	BD Bioscience
Kaninchen anti-phospho-beta-catenin (Ser33/37/Thr41)	Phospho-β-catenin	H, m, r, Mk	polyklonal	1:1000	Cell signalling
Kaninchen anti-p38 MAPK	p38α, β, γ MAPK	H, m, r, Mk, GP	polyklonal	1:1000	Cell signalling
Kaninchen anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9)	Phospho-p38 MAPK	H, m, r, Mk, Sc	monoklonal	1:1000	Cell signalling
Kaninchen anti-CEBP beta [E299] (ab32358)	C/EBPβ	H, m, r	monoklonal	1:1000	Abcam
Kaninchen anti-beta actin (ab8227)	β-actin	M,R,Sh,Rt, Ck,GP,C, D, H, P, XI, Mk,Rmk,CH	monoklonal	1:15 000	Abcam
Kaninchen anti-c-Myc (D84C12)	c-myc	H, m, r	monoklonal	1:1000	Cell signalling
Kaninchen anti-PTHLP (Ab-2) (34-53)	PTHLP (PTHrP)	H	polyklonal	1:100	Abcam
Kaninchen anti-phospho-p44/42 (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	Phospho-p44/42	H, m, r, Mk, Mi, Pg, Sc, Hm, B, Dm, Z, Dg	monoklonal	1:2000	Cell signalling

3.3.4 Osteocalcin-EIA

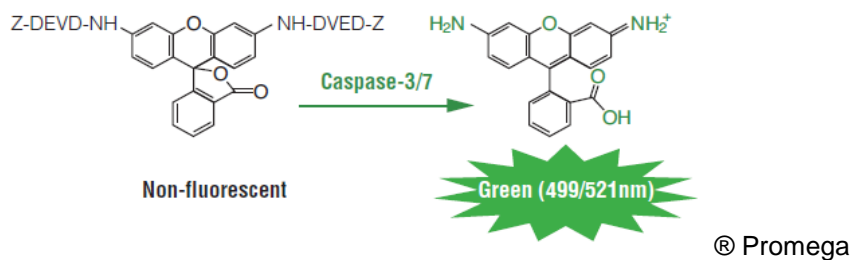
Die Bestimmung des von den Zellen sezernierten Osteocalcins erfolgte laut Herstellerangaben mithilfe des *RAT OSTEOCALCIN EIA Kit* (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA). Bei dieser Quantifizierung wurde Ratten Osteocalcin im Mediumüberstand nach dem Prinzip des Sandwich ELISAs gemessen.

3.3.5 BrdU-Assay

Um die Proliferationsrate der MSC zu messen, wurde ein *BrdU*-Assay (Roche, Penzberg, Deutschland) benutzt. Dabei wird der Einbau des Nukleotid-Analogon BrdU mit einem spezifischen Antikörper quantifiziert. Der HRP-TMB Farbumschlag wurde anschließend mittels ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen.

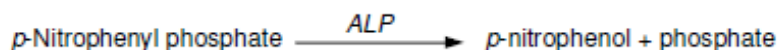
3.3.6 Caspase Assay

Ein *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega, Fitchburg, USA) wurde benutzt, um aktive Caspasen nachzuweisen und zu quantifizieren. Dabei wird ein fluoreszenzmarkiertes Substrat (Z-DEVD-R110) zu Rhodamin-110 umgesetzt und dient so als Maß der Menge an aktiven Caspasen. Das Rhodamin-110, das zu Beginn an das Caspasesubstrat gekoppelt ist, kann bei einer Extinktion von 485 ± 20 nm und einer Emission von 530 ± 25 nm (Ex_{max} 498 nm/ Em_{max} 521 nm) gemessen werden.



3.3.7 Alkalische Phosphatase Assay

Der Alkalische Phosphatase (ALP) Assay (BioAssay System, Hayward, USA) basiert auf einer enzymatischen Reaktion, bei der aus *p*-Nitrophenyl-Phosphat, durch ALP-vermittelte Hydrolyse, *p*-Nitrophenol und Phosphat entsteht:



Die Reaktionsrate ist dabei direkt proportional zur ALP-Aktivität und kann mit Hilfe eines ELISA-Readers (OD_{405nm}) und der folgenden Formel ermittelt werden:

$$\begin{aligned} &= \frac{(OD_{SAMPLEt} - OD_{SAMPLE0}) \cdot 1000 \cdot \text{Reaction Vol}}{t \cdot \epsilon \cdot l \cdot \text{Sample Vol}} \\ &= 266.7 \times (OD_{SAMPLEt} - OD_{SAMPLE0}) \end{aligned}$$

3.4 Histologie und Immunfluoreszenz

3.4.1 Alizarinrot S Färbung

Zum Nachweis von Kalziumablagerungen während der osteogenen Differenzierung wurde eine Alizarinrot S Färbung durchgeführt. Dabei wurden die unter osteogenen Bedingungen kultivierten MSC nach 7, 14 und 21 Tagen in 6-Well-Platten mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für zehn Minuten fixiert. Anschließend wurden die Wells mit Wasser gespült und für zwei Minuten mit 1 % Alizarinrot S Lösung (Sigma, St. Louis, USA) (in 25 % Ammoniak) gefärbt, wieder mit Wasser gewaschen und an einem Durchlichtmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U, Tokyo, Japan) fotografiert.

3.4.2 Ölrot O Färbung

Mit dem fettlöslichen Azofarbstoff Ölrot O können Lipidtröpfchen, die während der adipogenen Differenzierung entstehen, in MSC angefärbt werden. Dazu werden Zellen nach 7, 14 und 21 Tagen gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 bis 60 Minuten fixiert und mit Wasser gewaschen. Danach werden die Zellen für fünf Minuten mit Isopropanol und anschließend für zehn Minuten mit der Arbeitslösung inkubiert. Es wurde erneut mit Wasser gewaschen, die Platten feucht gehalten und an einem Durchlichtmikroskop fotografiert.

Benötigte Lösungen:

Stock Färbelösung: 300 mg Ölrot O (Sigma, St. Louis, USA) in 100 ml Isopropanol lösen;

Arbeitslösung: Drei Teile Stock Färbelösung mit zwei Teilen Wasser mischen, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, durch Filterpapier (Grad 3hw, Dia:185 mm 65 g/m²) (Sartorius stedim biotech, Göttingen, Deutschland) filtrieren und innerhalb von zwei Stunden benutzen;

3.4.3 Morphometrische Auswertung

Um histologische Färbungen wie die Alizarinrot S und Ölrot O Färbung quantifizieren zu können, wurden die gefärbten Zellen fotografiert und mit Hilfe von Photoshop CS3 morphometrisch ausgewertet. Dazu wurde die Pixelzahl des gesamten Bildes bestimmt und in Relation zur Pixelzahl der gefärbten Fläche gesetzt.

Für morphometrische Auswertungen von Westernblotsignalen wurden die Größe sowie die Intensität der detektierten Bande mithilfe von Photoshop CS3 bestimmt und in Relation zur Größe und Intensität des Signals der Ladekontrolle (β -actin) gesetzt.

3.4.4 Paraffinschnitte

3D-Kulturen von MSC (Aggregate) wurden in 4 % PFA (in 0,1 M Phosphatpuffer) für eine Stunde fixiert, mit PBS gewaschen, in aufsteigender Ethanol/Isopropanol-Reihe (50 %, 70 %, 2x 96 % Ethanol, 2x Isopropanol, 1:1 Isopropanol-Paraffin-Mischung) inkubiert, in Paraffin eingebettet, 5 µm dicke Schnitte hergestellt (Mikrom Mikrotom RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend mittels Xylol (Rotihistol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und absteigender Ethanol-Reihe (3x Xylol, 99 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol, Wasser) entparaffiniert, in PBS gestellt und mit verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Färbungen behandelt.

3.4.5 Weigert's Hämatoxylin und Alcianblau Färbung

Um Zellkerne auf histologischen Schnitten anzufärben, wurde Weigert's Hämatoxylin Lösung benutzt. Diese wird zu gleichen Teilen aus Lösung A und Lösung B, wie im Folgenden beschrieben, frisch vor dem Färben angesetzt:

Lösung A: 3,5 g Hämatoxylin (C.I.75290; Applichem, Omaha, USA) in 350 ml Ethanol 96 %;

Lösung B: 5,25 g Eisen(III)-Chlorid (Fluka, Milwaukee, USA) in 350 ml H₂O (dest.) und mit 3,5 ml konzentrierter HCl (Applichem, Omaha, USA) versetzen;

Die Schnitte wurden 15 Minuten darin inkubiert, mit destilliertem und anschließend mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Danach wurde für drei Minuten 3 %-ige Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (pH 2,5) auf die Schnitte gegeben.

Die Färbung mit Alcianblau erfolgte im Anschluss für 30 Minuten. Dafür wurde eine 1 %-ige Alcianblau Lösung (C.I.74240; Serva, Heidelberg, Deutschland) in 3 %-iger Essigsäure frisch hergestellt. Es folgte wieder ein Waschschriff für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend jeweils fünf Minuten Inkubation in aufsteigender Ethanol-Reihe (Wasser, 50 %, 70 %, 96 %, 99 % Ethanol). Zweimal wurde danach je zehn Minuten in Xylol inkubiert und die Schnitte mit *Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

3.4.6 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 75 % kultiviert. Für die Fixierung wurde 4 % PFA/TBS für zehn Minuten auf die Zellen pipettiert, die Zellen anschließend fünf Minuten mit 0,1 % Triton-X 100/TBS permeabilisiert und eine Stunde mit 3 % BSA/TBS-T blockiert. Der Primärantikörper (in 3 % BSA/TBS-T) wurde dann in entsprechender Verdünnung zu den Zellen pipettiert. Nach 3-maligem Waschen wurden die Zellen eine Stunde mit einem Alexa 488 - gekoppelten Sekundärantikörper (in 3 % BSA/PBST) inkubiert. Die Zellkerne wurden daraufhin mit

DAPI gefärbt. Zum Eindecken wurde *Vectashield Mounting Medium* benutzt. Es wurden von einem Versuch jeweils fünf Übersichtsbilder analysiert, indem die Dapi-Kern-Signale gezählt, und mit den p21- beziehungsweise Cyclin D1-Signalen verglichen und in Relation gesetzt wurden.

Antikörper für Immunfluoreszenz	Verdünnung
Maus anti-p21 (SX118) (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	1:50
Maus anti-Cyclin D1 (G124-326) (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	1:50

3.5 Durchflusszytometrische Messung

3.5.1 Zellzyklus Messung

Die Zellzyklusverteilung von MSC wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Dazu wurden die Zellen bis zu 75 % Konfluenz kultiviert, durch Serumentzug synchronisiert und anschließend, nach weiteren 24 bis 72 Stunden Wachstum in Proliferationsmedium, für die FACS-Analyse geerntet. Um das Verklumpen der Zellen zu verhindern, wurde dafür Accutase benutzt. Eine Million Zellen wurden dann bei 800 rpm für fünf Minuten pelletiert, mit 5 ml kaltem PBS inkl. 2 % BSA gewaschen und mit einem Methanol-Aceton Gemisch (3:1) vorsichtig für zehn Minuten auf Eis fixiert. Die fixierten Zellen wurden danach in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, bei 1000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS mit 2 % BSA gewaschen. Es folgte ein RNA-Verdau durch Zugabe von 100 µg/ml RNase A (Stock: 1 mg/ml) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C. Die DNA der Zellen wird dann mit 50 µg/ml Propidiumiodid (Stock: 1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) gefärbt und kann anschließend mit Hilfe des FACS Caliburs (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei einer Anregung von 488 nm gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm *FlowJo*.

3.5.2 Messung von Oberflächenmarkern

Die MSC wurden bei einer Konfluenz von etwa 75 % mit Accutase geerntet, für fünf Minuten bei 600 g zentrifugiert und in kalten FACS-Puffer (PBS mit 5 % FKS und 0,1 % NaN₃) aufgenommen. Für 20 Minuten wurden die Zellen dann in Blockierungspuffer (PBS mit 5 % Serum) aufgenommen und bei 4°C inkubiert. Die Zugabe des Primärantikörpers oder des Antiköpers für die Isotyp-Kontrolle erfolgt direkt im Blockierungspuffer für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Folgende Antikörper wurden dabei benutzt:

Tabelle 6 Liste der benutzten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Oberflächen-Antigen	Antikörper	Isotyp-Kontrolle	Gemessen in Fluoreszenz-Kanal
CD90	FITC-Maus anti-Ratte CD90/Maus CD90.1 -	IgG1, k - FITC (BD Pharmingen #550616)	(FL1)

Material und Methoden

	IgG1, k (BD Pharmingen: #554897)		
CD11b	PE-Maus anti-Ratte CD11b – IgA, k (BD Pharmingen: # 562105)	IgA, k - FITC (BD Pharmingen #562141)	(FL 2)
CD45	PE-Cy5-Maus anti-Ratte CD45 - IgG1, k (BD Pharmingen: # 559135)	IgG1, k – PE-Cy5 (BD Pharmingen #550618)	(FL 3)

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe des FACS Caliburs analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm *FlowJo*.

3.6 Inhibitionsversuche

3.6.1 MEK1/2 Inhibition mittels U0126

Mit dem spezifischen Inhibitor U0126 (Cell signaling, Danvers, Massachusetts, USA) wurde MEK 1 und MEK 2 blockiert. –SOX9, +SOX9 und Kontrollzellen wurden dabei für 30 Minuten bis zu zwei Stunden mit 10 µM U0126 oder DMSO inkubiert, mit Serum danach stimuliert und anschließend wurde RNA (3.2.2) und Protein (3.2.3) aus den Zellen isoliert.

3.6.2 Hemmung der Transkription mittels Actinomycin D

Der Transkriptionshemmer Actinomycin D (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde eingesetzt, um die mRNA-Stabilität und Halbwertszeit zu untersuchen. Die Zellen wurden mit 10 µg/ml Actinomycin D inkubiert und ein Teil der Zellen wurde zum Zeitpunkt Null, sowie nach einer halben, einer, zwei, vier und sechs Stunden geerntet, um die RNA (3.2.2) zu isolieren und mittels qPCR weiter zu untersuchen.

3.6.3 Hemmung der Proteinsynthese mittels Cycloheximid

Um die Stabilität bestimmter Protein zu bestimmen, wurde die Proteinsynthese mit Cycloheximid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) blockiert. Die Zellen wurden mit 10 µg/ml Cycloheximid inkubiert und ein Teil der Zellen wurde zum Zeitpunkt Null, sowie nach einer halben, einer, zwei, vier und sechs Stunden geerntet, um die Gesamtproteine (3.2.3) zu isolieren und weiter zu untersuchen.

3.7 Luciferase-Reporter-Assay

Um die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors Sox9 zu messen, wurde ein Sox9-Luciferase Reporter Gen Assay durchgeführt. Dabei wurde eine Mischung eines induzierbaren, Sox9-abhängigen *Firefly*-Luciferase-Konstrukts und eines konstitutiv exprimierenden

Renilla-Luciferase-Konstrukts in die MSC mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Das induzierbare Sox9-abhängige *Firefly*-Luciferase-Konstrukt enthält ein Stück des humanen *Col2a1* Promotors, was ein Zielgen von Sox9 ist, und uns freundlicherweise von Prof. Anja Bosserhoff (Pathologie, Uniklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt wurde. Das Renilla-Luciferase-Konstrukt dient der Normalisierung der Transfektionseffizienz.

Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mithilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Mannheim, Deutschland) für die Messung der *Firefly*- und Renilla-Luciferase am Luminometer DLReady (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) geerntet. Die Zellen wurden dafür für 20 Minuten mit 1x *Passive Lysis Puffer* inkubiert und 50 µl des Zelllysates und 50 µl *Luciferase Assay Reagent II* in Luminometer-Röhrchen pipettiert und die *Firefly*-Luciferase-Aktivität in *relative light units* gemessen. Anschließend wurden 50 µl *Stop&Glo Reagent* in das Luminometer-Röhrchen pipettiert und die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung eines nicht-induzierbaren *Firefly*-Luciferase-Konstrukts und eines konstitutiv exprimierenden Renilla-Luciferase-Konstrukts (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Ein analoges Protokoll wurde für den Dlx5-Luciferase-Reporter Assay benutzt.

3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm *GraphPad Prism* benutzt.

Die Berechnung, ob Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen signifikant sind, wurde immer mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. In Einzelfällen wurde ein ungepaarter t-Test benutzt, was dann in den Abbildungslegenden angegeben wurde.

4 Ergebnisse

Für die Versuche dieser Arbeit wurden hauptsächlich mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (rBMSC), sowie zusätzlich des subkutanen Fettgewebes (rASC), junger CD-Ratten benutzt. Stammzelltypen verschiedenen Ursprungs konnten so direkt miteinander verglichen werden. Darüber hinaus konnte untersucht werden, ob einige grundlegende Funktionen von Sox9 in adulten MSC allgemeine Gültigkeit haben oder Stammzell-spezifisch variieren. Wir waren außerdem in der Lage, durch den Einsatz von MSC aus unterschiedlichen Geweben, potentielle Effekte durch Kontamination mit anderen Zelltypen aufgrund der Isolierungsmethode auszuschließen, wie zum Beispiel unter 4.2.2 beschrieben.

4.1 Vergleich zwischen ASC und BMSC

4.1.1 Vergleichende Analyse von Oberflächenmarkern

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker zwischen rASC und rBMSC in Passage 1 und 2 wurde mittels FACS-Analysen untersucht und die Fähigkeit der beiden Zelltypen in Adipozyten und Osteoblasten zu differenzieren überprüft.

Abbildung 4.1 A zeigt, dass sowohl rASC als auch rBMSC nach drei Wochen Stimulation mit den entsprechenden Medien (siehe 3.1.2) zu Adipozyten beziehungsweise Osteoblasten differenzieren. Die Alizarinrot S Färbung zeigte dabei die kalzifizierten Bereiche nach osteogener Differenzierung an (Pfeil) und die Ölrot O Färbung visualisierte Lipidtropfen, die typischerweise bei der adipogenen Differenzierung entstehen (Pfeil).

In durchflusszytometrischen Untersuchungen von Oberflächenmarkern wurde deutlich, dass vor allem in Passage 2 rASC sowie rBMSC zu je mehr als 97% CD90-positiv und CD45- und CD11b-negativ waren (Abbildung 4.1 B). In Passage 1 konnte allerdings ein Unterschied bezüglich CD11b festgestellt werden. In der rASC-Population waren nur 3% positive Zellen zu finden, wohingegen rBMSC in Passage 1 eine Population von 11% CD11b-positiven Zellen aufwies (Abbildung 4.1 B, Pfeil). CD11b ist als Marker für Leukozyten beschrieben, darunter Monozyten, Neutrophile, natürliche Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen. CD45 ist ein klassischer Marker hämatopoetischer Zellen, und CD90 ist auf einer Vielzahl von Stammzelltypen exprimiert.

rASC wie auch rBMSC besitzen einen vergleichbaren „Stammzell-Charakter“ in Passage 2. Um einen Sox9 *Knockdown* beziehungsweise eine Sox9 Überexpression zu generieren, fanden alle in der Folge beschriebenen Transduktionen in Passage 2 statt. Somit sollte sichergestellt sein, dass die Ergebnisse reproduzierbar und vergleichbar sind.

Charakterisierung von rASC und rBMSC

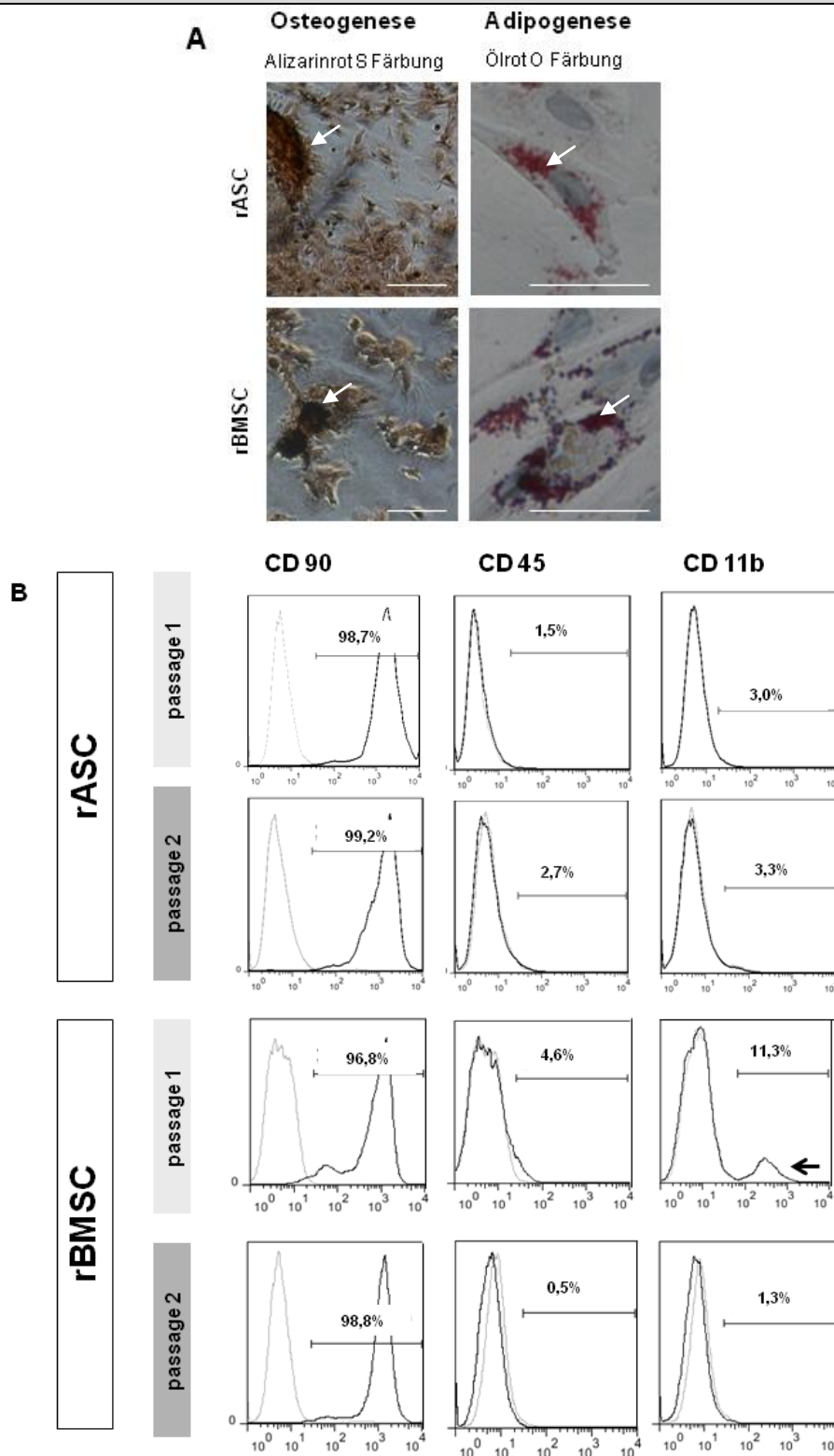


Abbildung 4.1 A) Mithilfe histologischer Färbungen wurden MSC aus dem Fettgewebe (rASC) und dem Knochenmark (rBMSC) von Ratten auf ihre Fähigkeit osteogen (Alizarinrot O) und adipogen (Ölrot O) zu differenzieren, untersucht. Die Pfeile zeigen stark gefärbte und somit gut differenzierte Areale an. Größenbalken entsprechen 100 µm.

B) Durchflusszytometrische Analysen zeigen für beide Zelltypen hauptsächlich CD90-positive, sowie CD45- und CD11b-negative Zellen (dunkelgrau). rBMSC in Passage 1 weisen noch 11% CD11b-positiver Zellen auf (Pfeil). Hellgrau: Isotyp-Kontrolle;

4.1.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse

Um Unterschiede in der Expression verschiedener Markergene zwischen rASC und rBMSC zu verifizieren, wurden die Zellen in Passage 1 und Passage 2 mittels qPCR untersucht. Abbildung 4.2 A und B zeigen die Regulierung von *Alkalische Phosphatase (Alp)*, *Kollagen Typ I (Col1a1)*, *Mmp13*, *Osteocalcin*, *Runx2*, *Sox9*, *Vegfa* und *Integrin alpha 11 (Itga11)* in rASC, bezogen auf die Expression in rBMSC. Signifikante Unterschiede des Expressionslevels in Passage 1 konnte für *Alp*, *Mmp13*, *Osteocalcin*, *Vegfa* und *Itga11* gezeigt werden. In Passage 2 war die Expression von *Col1a1*, *Mmp13*, *Osteocalcin*, *Runx2*, *Sox9*, *Vegfa* und *Itga11* signifikant reguliert. *Sox9* zeigte in Passage 2 die stärkste Regulierung mit einer bis zu 1000-fach erhöhten Expression in rASC verglichen mit rBMSC. Western Blot Analysen bestätigten die verstärkte *Sox9* Expression in rASC in Passage 2 (Abb. 4.2 C) im Vergleich zu rASC in Passage 1, wie auch im Vergleich zu rBMSC. Diese Western Blot Ergebnisse konnten auch auf RNA-Ebene bestätigt werden und zeigen den relativen Verlauf der *Sox9* mRNA Expression, jeweils bezogen auf rASC Passage 1, wie in Abbildung 4.2 D dargestellt.

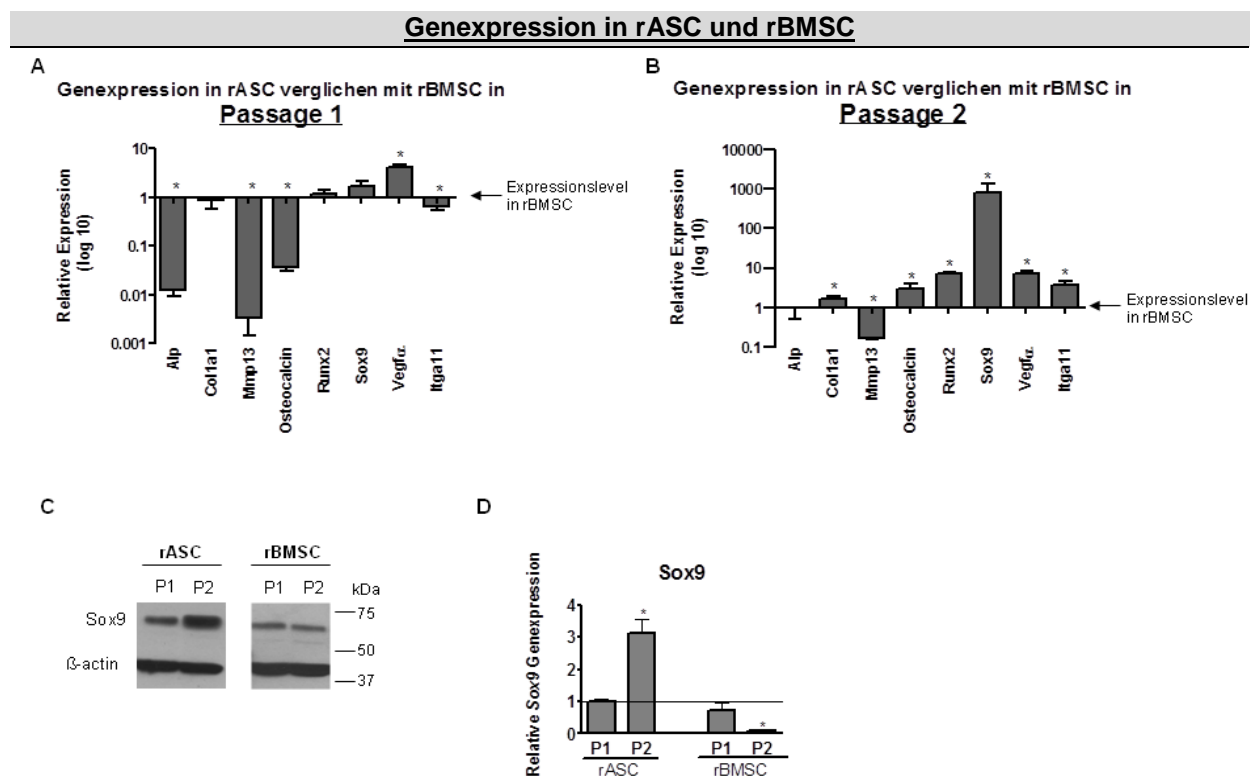


Abbildung 4.2 Genexpressionsanalysen von rASC im Vergleich zu rBMSC in Passage 1 (A) und Passage 2 (B). Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, $n = 4$; C) Ein repräsentativer Western Blot bestätigt die erhöhte *Sox9* Expression in rASC in Passage 2. β -actin dient als Ladekontrolle; $n = 3$; D) Relative qPCR Analysen bestätigen die Western Blot Daten aus C) und zeigen die verstärkte *Sox9* mRNA Expression in rASC; Calibrator rASC P1; Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, $n = 4$;

Es zeigten sich also deutliche Unterschiede in der Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 in Stammzellen verschiedenen Ursprungs sowie nach verschieden langer Kulturzeit (Passage 1 und 2). Es kann daher vermutet werden, dass gewebespezifische Funktionen von Sox9 existieren.

Für die Mehrzahl der im Folgenden durchgeführten Experimente zur Aufklärung der Rolle von Sox9, wurden rBMSC, auf Grund ihrer gut charakterisierten Eigenschaften, benutzt. Der Einfluss von Sox9 auf grundlegende biologische Funktionen wie Proliferation, Apoptose und das osteogene Differenzierungspotential wurde zusätzlich auch in rASC untersucht, um die universelle Gültigkeit zu überprüfen.

4.2 Generierung eines Sox9 *Knockdowns* und einer Sox9 Überexpression in undifferenzierten rMSC

Um einen Sox9 *Knockdown* zu generieren, wurden mesenchymale Stammzellen (rBMSC oder rASC) entweder mit einer Sox9-spezifischen shRNA transduziert oder ein Sox9 Überexpressionskonstrukt in die Zellen appliziert, um die Sox9-Dosis zu erhöhen. Die Transduktionen erfolgten mittels Retroviren, wobei ein *scrambled*-shRNA Vektor und ein leerer Überexpressions-Vektor als Kontrollen dienten. Beide werden im Folgenden als „Control“ bezeichnet.

Die Änderung der Sox9 Expression wurde für alle folgenden Experimente mittels qPCR und Western Blot Analysen verifiziert. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wurde in rBMSC zusätzlich anhand eines Luciferase-Reporter-Assays ermittelt. Abbildung 4.3 zeigt die Änderung der Sox9-Dosis für rBMSC auf RNA-, Protein- und Aktivitäts-Ebene, sowie Abbildung 4.4 zum Vergleich für rASC auf RNA-Ebene. Gezeigt sind dabei in Abbildung 4.3 A und 4.4 die absoluten Sox9 cDNA Kopien pro 100ng RNA, wobei wieder die höhere Expression in rASC, verglichen mit rBMSC, deutlich wird.

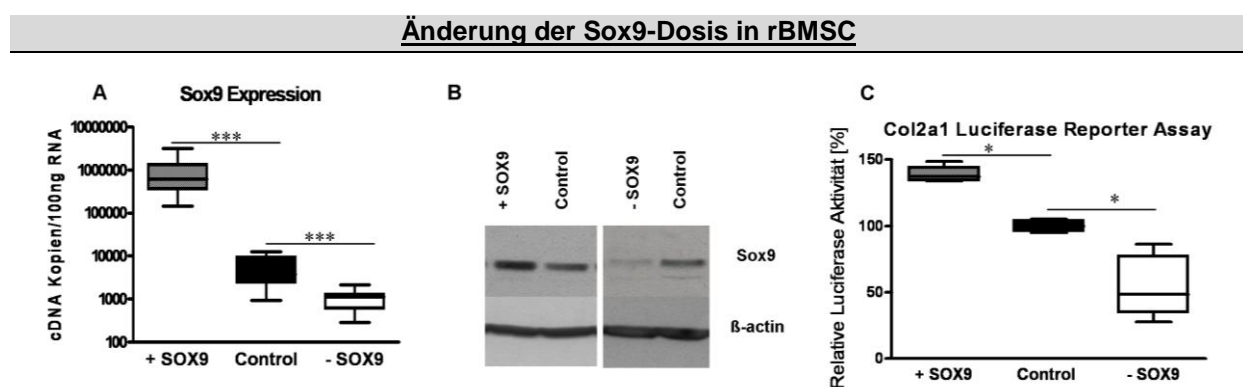


Abbildung 4.3 Änderung der Sox9-Dosis nach retroviraler Transduktion einer Sox9 shRNA (-SOX9) beziehungsweise eines Sox9 Überexpressionskonstrukts (+SOX9) in rBMSC. qPCR Analysen zeigen eine deutliche Regulierung auf mRNA-Ebene (A), Western Blot Analysen auf Protein-Ebene (B), sowie ein Luciferase-Reporter Assay auf Aktivitätsebene (C); Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. *p<0,05, *p<0,001; n≥5**

Die mRNA Messungen zeigten eine im Mittel 10- bis 100-fache Überexpression von Sox9 in rBMSC, wenn das Überexpressionskonstrukt transduziert wurde (+SOX9), und eine Verringerung der mRNA Expression auf 50% bis 10% nach shRNA Applikation (-SOX9) verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 4.3 A). Mit Hilfe eines polyklonalen anti-Sox9 Antikörpers wurde das endogene Sox9 Protein detektiert. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Sox9 Proteinmenge in -SOX9 Zellen und eine gesteigerte Proteinmenge in +SOX9 Zellen (Abb. 4.3 B). Entsprechend der Menge an Sox9 Protein, zeigte auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors signifikante Änderungen (Abb. 4.3 C). Um dies zu messen, wurde ein Luciferase-Reporter Plasmid benutzt, bei dem vor die kodierende Sequenz des Luciferasegens ein Teil des *Kollagen Typ II* Promotors kloniert wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Anja Bosserhoff, Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg). Da *Kollagen Typ II* ein Zielgen von Sox9 ist, kann anhand der Aktivität des Reporterenzym ein Rückschluss auf die Sox9 Aktivität gezogen werden. In -SOX9 rBMSC wurde im Mittel nur etwa die Hälfte, in +SOX9 rBMSC fast eine Verdopplung, der Luciferase Emission gemessen verglichen mit der jeweiligen Kontrolle.

Alle Versuche, die auf RNA-, Protein- und Aktivitätsebene keine hinreichende Veränderung bezüglich Sox9 zeigten, was bedeutet, mindestens eine Halbierung beziehungsweise Verdopplung des Sox9-Levels, wurden nicht in die Auswertungen mit eingeschlossen.

Änderung der Sox9 mRNA-Dosis in rASC

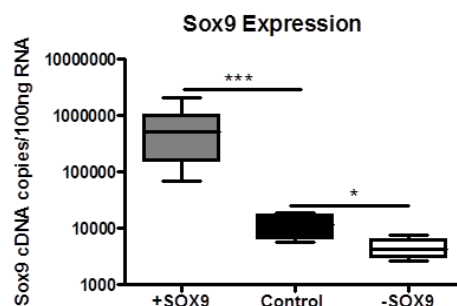


Abbildung 4.4 Änderung der Sox9 mRNA-Dosis nach retroviraler Transduktion einer Sox9 shRNA (-SOX9) beziehungsweise eines Sox9 Überexpressionskonstrukts (+SOX9) in rASC, gemessen via absoluter qPCR Analysen.

Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$, * $p < 0,001$; $n = 4$**

In rASC Kontrollzellen liegt die Zahl der Sox9 cDNA Kopien pro 100ng RNA bei etwa 10.000 Kopien im Mittel. Für rBMSC zum Vergleich konnten etwa 7.500 Kopien in den Kontrollzellen im Durchschnitt gemessen werden. Nach Applikation der Sox9 shRNA in rASC verringerte sich die Sox9 Gendosis um 40 – 50 %, und nach Transduktion des Überexpressionskonstrukts kam es zu einer 20 bis 100-fachen Erhöhung der Genexpression von Sox9.

4.3 Expression verschiedener Markergene in rBMS

Sox9 wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Expression verschiedener Gene. Dies kann direkt oder auch indirekt, über Cofaktoren beziehungsweise über der Aktivierung von Inhibitoren oder Aktivatoren, passieren. Wir haben die relative mRNA Expression von spezifischen Markergenen nach Sox9 *Knockdown* und Überexpression in rBMS mittels quantitativer PCR ermittelt und auf Kontrollzellen kalibriert. In Abbildung 4.5 sind die Genexpressionsdaten zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von Sox9 die mRNA Expression von *Alkalischer Phosphatase (Alp)*, *Kollagen Typ I (Col1a1)*, *Kollagen Typ II (Col2a1)*, *Integrin alpha 11 (Itga11)*, *Mmp13*, *p300*, *Runx2*, β -*Catenin* und *Vegfa* erhöht. Dieser Effekt war für alle Gene, außer *Col2a1* und β -*Catenin*, reversibel in -SOX9 rBMS und resultierte in einer verminderten Expression. *Col2a1* konnte nicht detektiert werden, wenn Sox9 inhibiert wurde und die β -*Catenin* Messungen unterlagen starken versuchsabhängigen Schwankungen.

Genexpression nach Änderung der Sox9-Dosis in rBMS

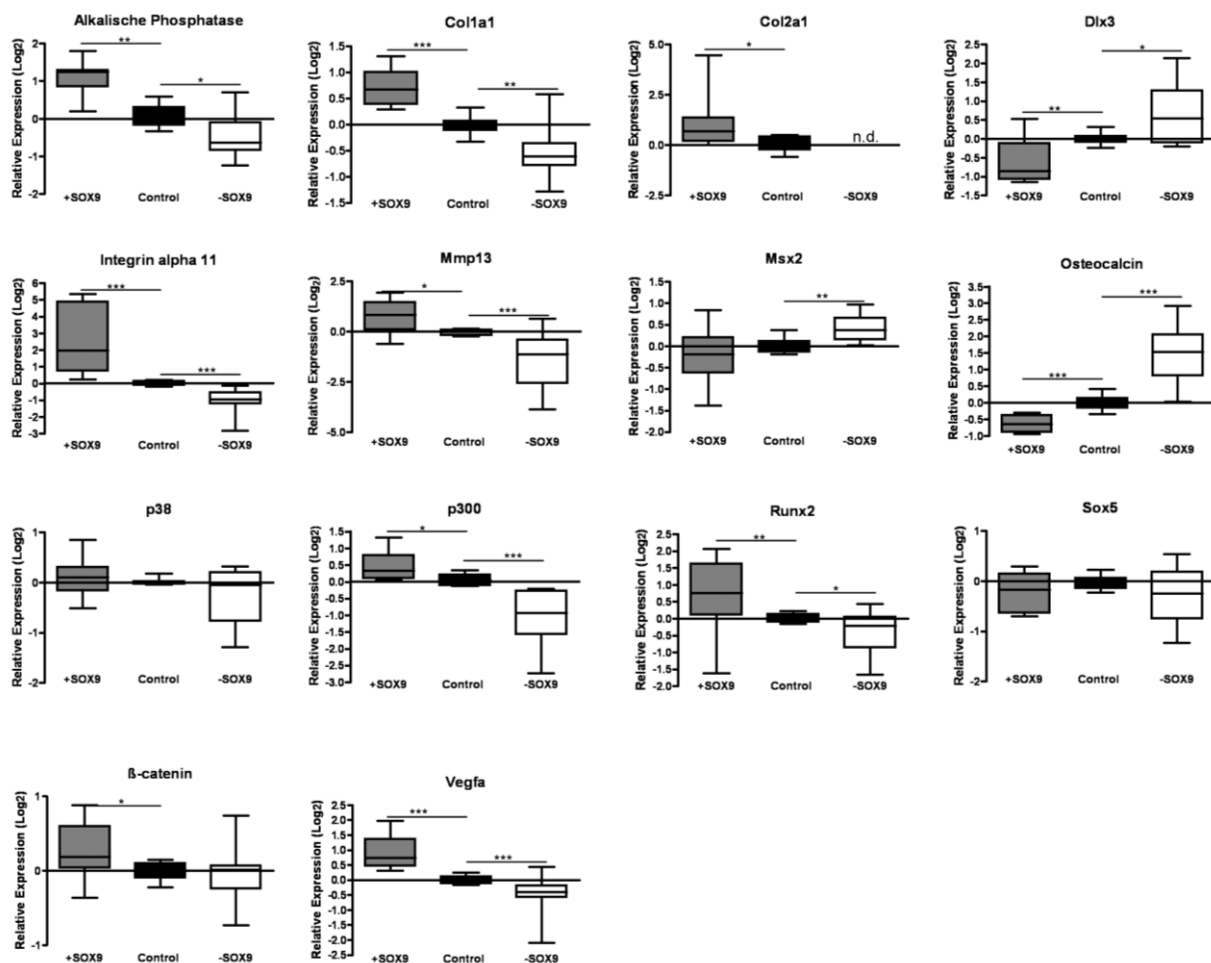


Abbildung 4.5 Die Genexpression verschiedener Marker nach Sox9 Überexpression (+SOX9) und *Knockdown* (-SOX9) in rBMS wurde mittels quantitativer PCR gemessen; Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n \geq 10$

In -SOX9 Zellen konnte eine erhöhte Expression von *Dlx3*, *Msx2* und *Osteocalcin* gemessen werden, drei Gene die typischerweise in Osteoblasten exprimiert werden. *Dlx3* und *Osteocalcin* zeigten nach Sox9 Überexpression eine inhibierte Genexpression.

Sox5 und *p38 MAPK* zeigten keine Regulierung nach Änderung der Sox9-Dosis (Abb. 4.5).

4.4 Eine Sox9 Reduktion erhöht die Osteocalcinsekretion über einen unbekannten, indirekten Mechanismus

Ein interessantes Ergebnis der mRNA Analysen war die Hochregulierung der *Osteocalcin* Expression nach Sox9 *Knockdown* (Abb. 4.5). Osteocalcin gilt als Osteoblastenmarker und ist ein Bestandteil der Knochenmatrix. Es wird sezerniert und kann somit im Blut, beziehungsweise wie in unserem Fall *in vitro* im Zellkultur-Überstand, gemessen werden. Offensichtlich wirkt die verstärkte Expression von Sox9 inhibierend, und die Reduktion von Sox9 stimulierend auf die Osteocalcin mRNA. Um festzustellen ob auch die Proteinmenge durch Sox9 beeinflusst wird, wurde ein *Ratten Osteocalcin EIA Kit* benutzt. -SOX9 rBMSC wiesen dabei signifikant mehr Osteocalcin im Überstand auf, verglichen mit den Kontroll-rBMSC. In +SOX9 Zellen lag die Osteocalcin Menge unterhalb des Detektionsminimum (Abb. 4.6).

Osteocalcin Sekretion in rBMSC

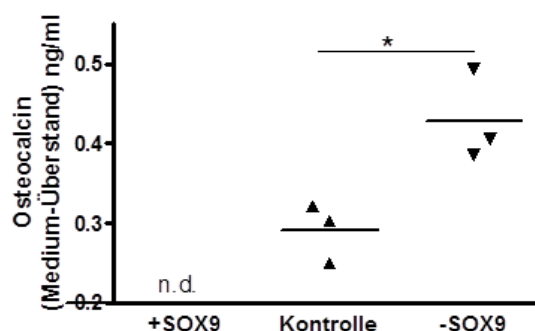


Abbildung 4.6 Die Messung von Osteocalcin im Zellkultur-Überstand von rBMSC zeigt eine signifikant erhöhte Menge in -SOX9 rBMSC, wohingegen in +SOX9 rBMSC die Menge an Osteocalcin unter dem Detektionsminimum von 0,2 ng/ml liegt; (nicht detektierbar = n.d.); Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ mit ungepaartem t-test; $n=3$;

Um auszuschließen, dass Osteocalcin nur auf Grund einer Osteoblastenverunreinigung innerhalb unserer Stammzellkultur gemessen werden konnte, wurde die Osteocalcin Genexpression in rASC gemessen. Abbildung 4.7 zeigt, dass es in rASC ebenfalls zu einer Regulierung der *Osteocalcin* mRNA nach Sox9 *Knockdown* und Überexpression kommt, wodurch eine Kontamination mit Osteoblasten als Ursache für eine *Osteocalcin* Expression ausgeschlossen werden kann.

Osteocalcin Genexpression in rASC

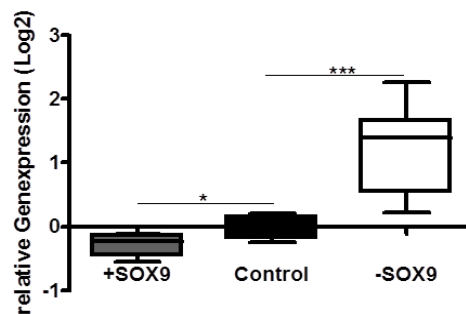


Abbildung 4.7 qPCR Analysen zeigen eine erhöhte *Osteocalcin* Expression in –SOX9 rASC und eine verringerte Expression in +SOX9 rASC im Vergleich zur Kontrolle. Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$, * $p < 0,001$; $n = 6$**

Der Promotorbereich von *Osteocalcin* zeigt kein potenzielles Bindemotiv für Sox9 ((A/T)(A/T)CAA(A/T)G (Oh, Maity et al. 2010)), was mit Hilfe einer Ensemble-Recherche verifiziert wurde. Somit ist die Möglichkeit einer direkten Bindung von Sox9 am *Osteocalcin*-Promotor ausgeschlossen.

Ein Regulator der *Osteocalcin* Expression, *Dlx5*, zeigte bei dieser Recherche allerdings eine Sox9 Bindestelle in seinem Promotorbereich. Aus diesem Grund wurde mittels eines Luciferase-Reporter-Assays untersucht, ob Sox9 durch direkte Bindung am *Dlx5* Promotor die Transkription von *Dlx5* in rBMSC regulieren kann (*Dlx5*-LUC-Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Richard Bauer, MKG, Uniklinikum Regensburg). Die Experimente zeigten keine Änderung der gemessenen Luciferaseaktivität (Abb.4.8) und somit keine Bindung von Sox9, was eine indirekte Aktivierung der *Osteocalcin* Expression über direkte *Dlx5*-Bindung durch Sox9 in rBMSC unwahrscheinlich macht.

Keine Sox9-Bindung am *Dlx5* Promotor in rBMSC

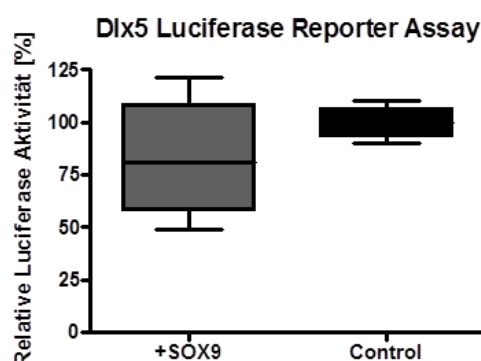


Abbildung 4.8 Ein Luciferase Reporter Assay zur Untersuchung einer potentiellen direkten Bindung von Sox9 am *Dlx5* Promotor in rBMSC ergab keine Induktion der Luciferase Emission. Somit kann eine direkte Bindung von Sox9 an den *Dlx5*-Promotor in undifferenzierten rBMSC ausgeschlossen werden; Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM; $n = 4$

4.5 Sox9 inhibiert die Apoptose in rBMSC, aber nicht in rASC

Die apoptotische Aktivität in rBMSC nach Sox9 *Knockdown* und Überexpression wurde anhand der Caspase 3/7 Aktivität bestimmt. Wir fanden eine deutliche Induktion der Apoptose in Sox9 *Knockdown* Zellen um etwa 20 %, wohingegen nach Sox9 Überexpression die Apoptoserate um 25 % abnahm (Abb. 4.9 A).

Darüber hinaus wurde die Expression des anti-apoptotischen Gens *Bcl-2* via qPCR gemessen. Überexprimiert man Sox9 in rBMSC, verdoppelt sich die *Bcl-2* Expression, wohingegen ein Sox9 *Knockdown* zu einer auf 30 % reduzierten Expression führt (Abb. 4.9 B). Die Analyse der Proteinexpression von Bcl-2, Bax (pro-apoptotisch) sowie von Bag-1 ist in Abbildung 4.9 C gezeigt. Bag-1, welches die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 verstärken kann, zeigte in +SOX9 rBMSC eine schwache Hochregulierung, Bax dagegen leicht verstärkte Expression in –SOX9 rBMSC und Bcl-2 wies die deutlichste Expressionsänderung auf. In +SOX9 rBMSC konnte, entsprechend den RNA Daten (Abb. 4.9 B), auch vermehrt Bcl-2 Protein detektiert werden, wohingegen –SOX9 rBMSC einen verringerten Bcl-2 Level aufwiesen. Daraus lässt sich das Bax/Bcl-2-Verhältnis berechnen, was als Maß für die Apoptose dient. Sox9 *Knockdown* rBMSC zeigen ein 1,5-fach höheres Bax/Bcl-2 Verhältnis, vor allem vermittelt durch eine verstärkte Bcl-2 Expression (Abb. 4.9 D). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen anti-apoptotischen Effekt von Sox9 in undifferenzierten rBMSC.

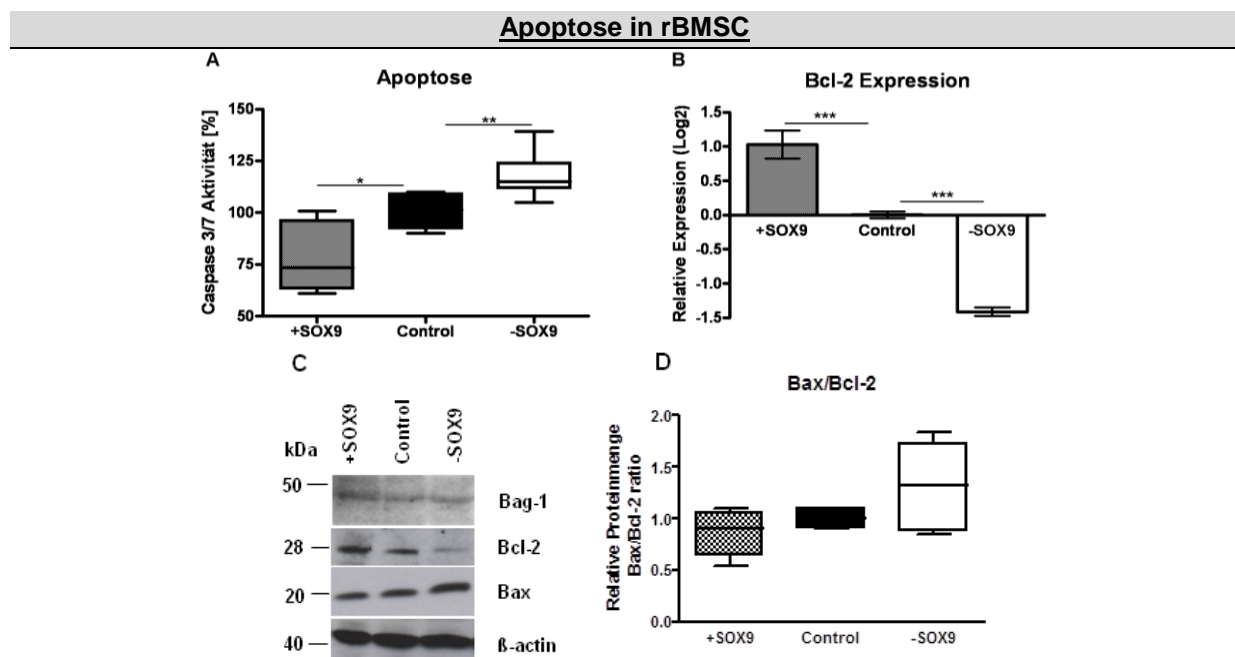


Abbildung 4.9 Erhöhte apoptotische Aktivität in –SOX9 und verringerte Apoptose in +SOX9 rBMSC. A) Mittels eines Caspase Assays wurde die Rate an aktiven Caspasen 3 und 7 bestimmt. B) QPCR Analysen zeigen eine Regulation des anti-apoptotischen Gens *Bcl-2*. C) Auf Proteinebene wurde durch Western Blot Analysen die Regulierung von Bag-1, Bcl-2 und Bax gezeigt. D) Die Bestimmung des relativen Bax/Bcl-2 Verhältnisses, durch densitometrische Auswertung der Western Blot Signale, ergibt einen erhöhten Wert in –SOX9 rBMSC ($p=0,06$). Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, * $p<0,001$; $n\geq 5$**

Im Gegensatz dazu konnte für rASC keine Regulierung der Apoptose nach Sox9 Inhibition festgestellt werden. Weder die Caspase 3/7-Aktivität (Abb. 4.10 A) noch die Genexpression von *Bcl-2* (Abb. 4.10 B) zeigten eine Regulierung nach Sox9 *Knockdown*. Bei dem Einfluss von Sox9 auf die Apoptose in rBMSC (Abbildung 4.9) handelt es sich demnach vermutlich um eine gewebespezifische Funktion des Transkriptionsfaktors und ist nicht grundsätzlich für mesenchymale Stammzellen anderen Ursprungs gültig.

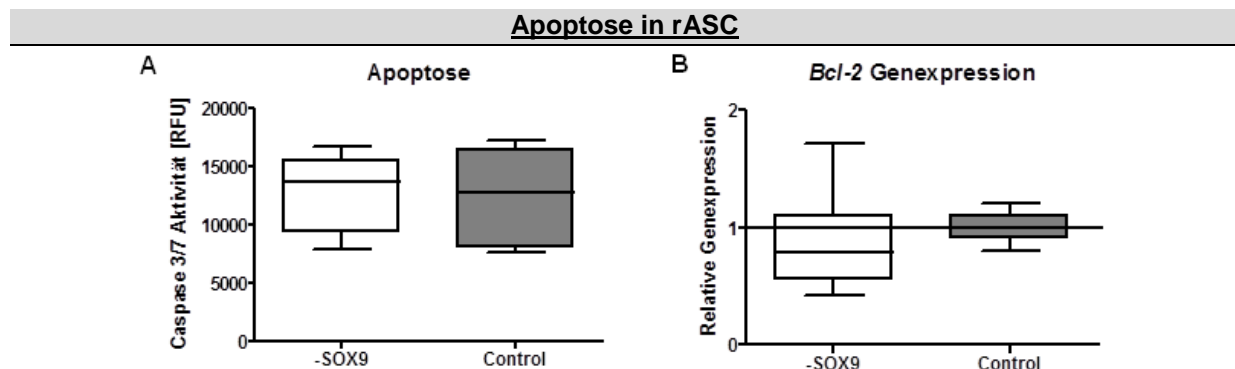


Abbildung 4.10 Eine Inhibition von Sox9 hat keinen Einfluss auf die Apoptose in rASC. Die ELISA-basierte Messung von aktiven Caspasen 3 und 7 (A), sowie die Messung der mRNA Expression von *Bcl-2* mittels qPCR (B), zeigen keine Regulierung nach Sox9 *Knockdown*. Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM; n=3

4.6 Sox9 verstärkt die Proliferation in rBMSC und rASC

Neben Apoptose kann auch das Zellwachstum die Ursache für eine veränderte Zellzahl einer Population sein. Ein BrdU-ELISA Assay zeigte, dass die Zellproliferationsrate in +SOX9 rBMSC um etwa 30 % gesteigert war. In –SOX9 rBMSC zeigte sich ein um 20 % verminderter BrdU-Einbau, was auf eine verlangsamte Proliferation schließen lässt (Abb. 4.11 A).

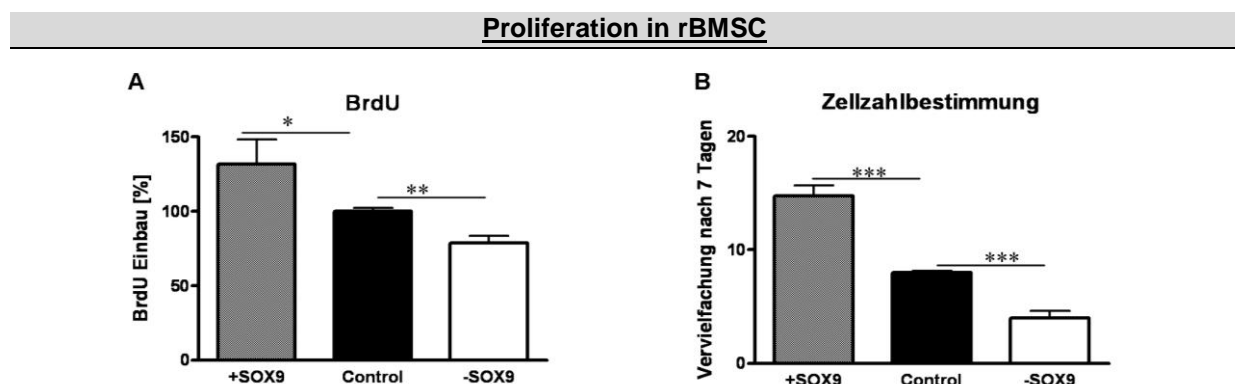


Abbildung 4.11 Eine erhöhte Proliferationsrate in +SOX9 rBMSC und ein verlangsamtes Wachstum in –SOX9 rBMSC wurden mit Hilfe eines BrdU-ELISA (A), sowie durch eine Zellzahlbestimmung über einen Zeitraum von 7 Tagen (B), gemessen; Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$; n=6**

Ergebnisse

Um eine Wachstumskinetik zu erstellen, wurde die Zellzahl vor und nach einer 7-tägigen Wachstumsperiode bestimmt. Die Ergebnisse bestätigten die Daten des BrdU-ELISAs. Kontrollzellen zeigten eine Verachtfachung, -SOX9 Zellen eine Vervierfachung und +SOX9 Zellen eine Verfünzfachung der Zellzahl (Abb. 4.9 B). Die daraus resultierende Verdopplungszeit beträgt 2,3 Tage für Kontrollzellen, 3,5 Tage für -SOX9 und 1,8 Tage für +SOX9 rBMSC.

Auch rASC zeigten eine reduzierte Proliferation nach Sox9 *Knockdown*. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Zellzahl nach 72 Stunden Wachstum, verglichen mit Kontroll-rASC, gemessen werden (Abb. 4.12 A). Die Verdopplungszeit von -SOX9 rASC betrug dabei 2,5 Tage und von Kontroll-rASC 2,2 Tage. Außerdem zeigten rASC, wie auch schon rBMSC, eine 20 %-ige Reduktion des BrdU-Einbaus nach Sox9 Inhibition (Abb. 4.12 B). Zusammenfassend hemmt eine Inhibition von Sox9 die Proliferation in rASC wie auch in rBMSC, womit die pro-proliferative Funktion von Sox9, ungeachtet des Stammzellursprungs, allgemeine Gültigkeit zu haben scheint.

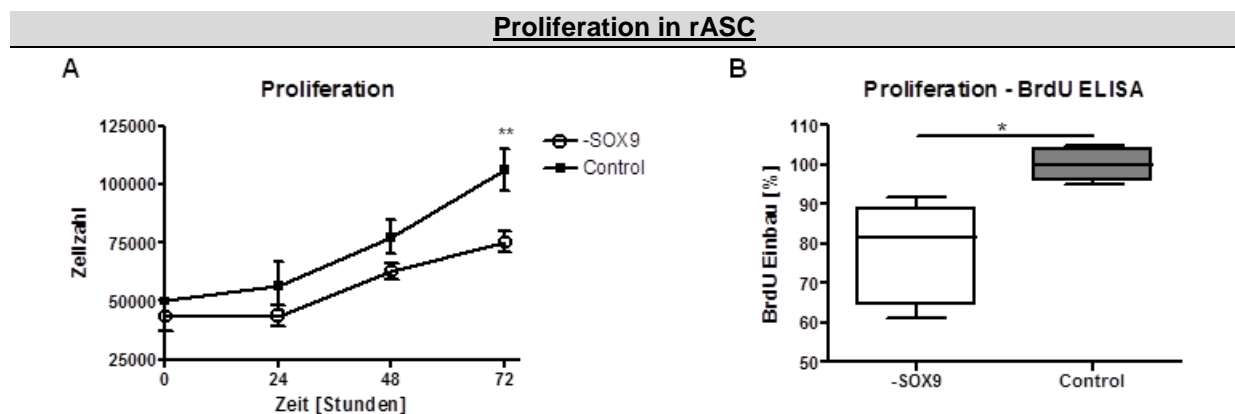


Abbildung 4.12 Die Proliferation in -SOX9 rASC wurde mit Hilfe einer Wachstumskinetik (A) und eines BrdU ELISA Assays (B) bestimmt. Beides zeigt eine Hemmung der Proliferation nach Sox9 Inhibition; Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 4$

4.7 Sox9 beschleunigt den Eintritt in die S-Phase in rBMSC und rASC

Die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus mittels Propidiumiodidfärbung ergab vor allem eine Veränderung der S-Phase Population. In Abbildung 4.13 A zeigt die rot markierte Fläche Zellen während der DNA-Replikation (S-Phase) an.

Wird Sox9 überexprimiert, zeigten synchron wachsende rBMSC einen signifikant höheren Anteil an S-Phase-Zellen, verglichen mit der Kontrolle, was auf einen beschleunigten Eintritt in die S-Phase hindeutet. Sox9 *Knockdown* rBMSC hingegen weisen einen geringeren Anteil von S-Phase-Zellen auf. Relativ ausgewertet nimmt der Anteil an S-Phase-Zellen um etwa 10 % zu wenn Sox9 in rBMSC überexprimiert wird (Abb. 4.13 B) und in der Sox9 *Knockdown* Population dagegen um 7 % ab (Abb. 4.13 C).

Zellzyklus in rBMSC

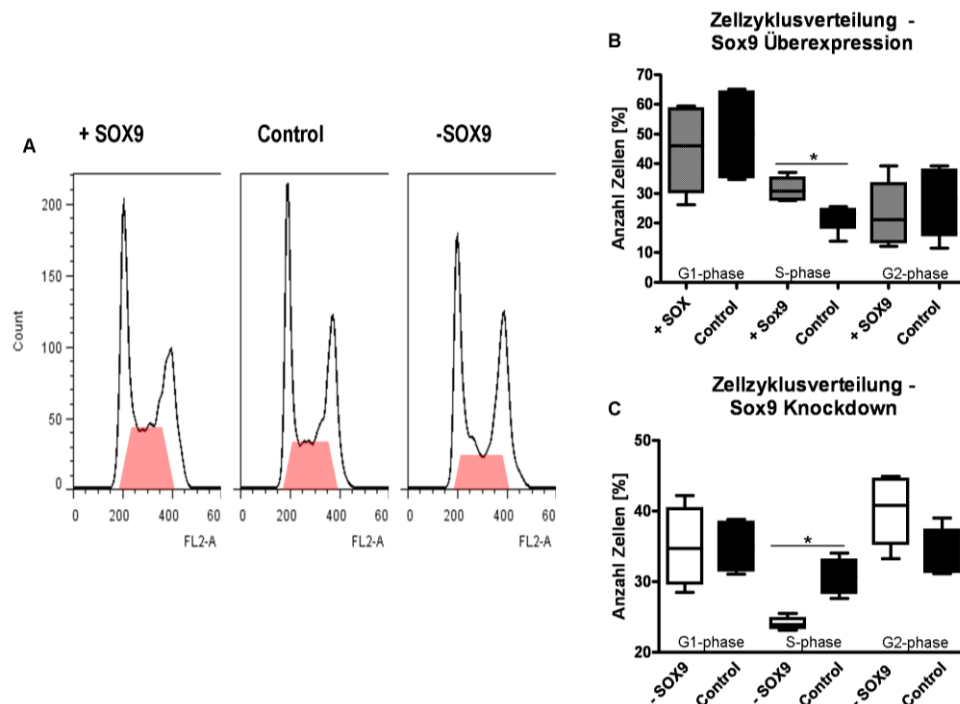


Abbildung 4.13 A) Durchflusszytometrische Analysen des Zellzyklus zeigen einen erhöhten Anteil an S-Phase-Zellen (rot) in +SOX9 rBMSC und einen verringerten Anteil in -SOX9 rBMSC. 10 % beträgt der Anstieg der S-Phase Zellen nach Sox9 Überexpression (B) und 7 % die Abnahme der S-Phase-Zellen nach Sox9 *Knockdown* (C). Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n = 4$

Abbildung 4.14 zeigt, dass eine Inhibition von Sox9 in rASC ebenso in einer 7 %-igen Reduktion der Anzahl der S-Phase-Zellen resultiert. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis auf einen allgemein gültigen Mechanismus der Wachstumsregulation in MSC durch Sox9.

Zellzyklus in rASC

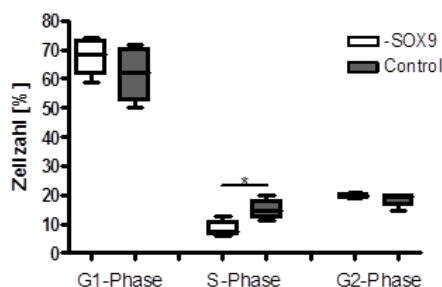


Abbildung 4.14 Durchflusszytometrische Analysen der Zellzyklusverteilung zeigen eine Abnahme der S-Phase Zellen um 7 % nach Sox9 Inhibition in rASC im Vergleich zu Kontroll-rASC. Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n = 4$

4.8 Ein PCR-basierter *Microarray* zur Untersuchung von Zellzyklus-Genen zeigt die Regulierung von *Schlafen-1*, *Ddit* und *Gpr132* nach Sox9 *Knockdown* in rBMSC

Um die Auswirkung von fehlendem Sox9 auf Proliferation und Zellzyklus in undifferenzierten rBMSC zu spezifizieren, wurde eine PCR-*Microarray* Analyse durchgeführt, bei der die Expression von 84 verschiedenen Zellzyklus-assoziierten Genen gemessen wurde. cDNA aus vier verschiedenen, unabhängigen *Knockdown* Versuchen wurde dafür eingesetzt, wobei der *Knockdown* zwischen 50% und 83% auf RNA-Ebene variierte. Nur drei Gene zeigten reproduzierbar eine Regulierung ihrer Expression. LOC688900, auch als *Slfn1* (*Schlafen-1*) bezeichnet, war in allen vier Arrays beeinflusst, wobei dreimal die Expression verstärkt, einmal aber vermindert war (Abb. 4.15). *Ddit3* (*DNA damage inducible transcript 3*) und *Gpr132* (*G-protein-coupled receptor 132*) waren jeweils in zwei der vier Versuche hochreguliert.

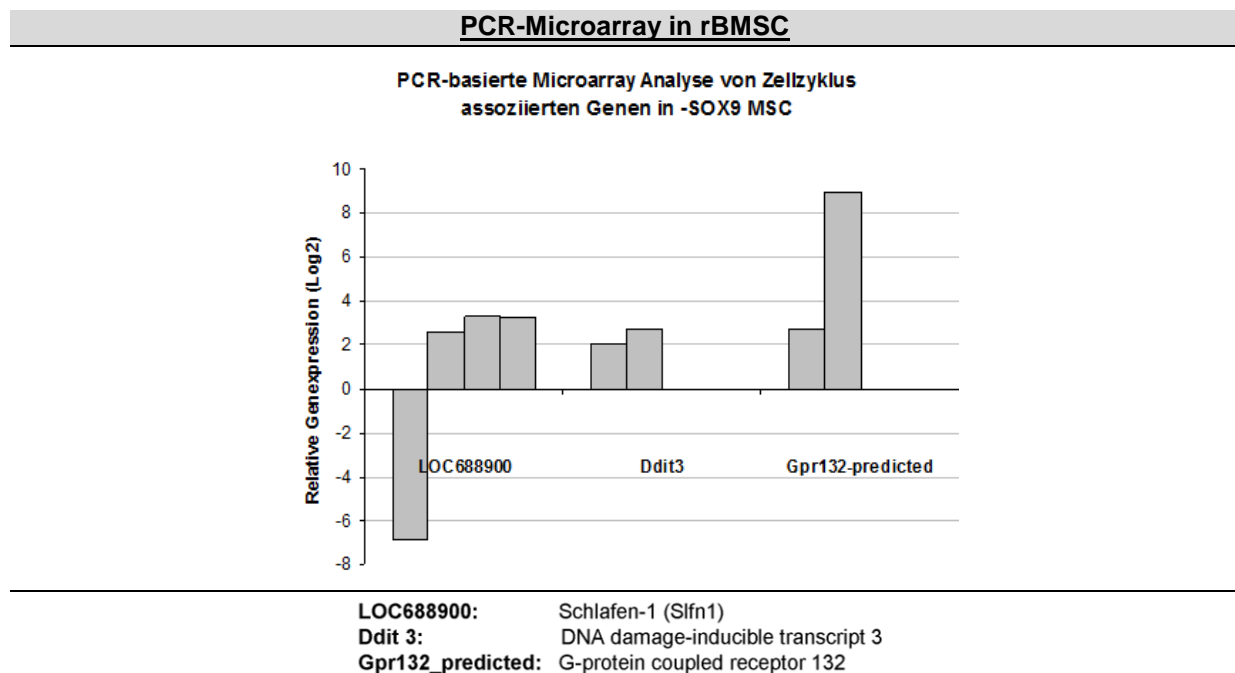


Abbildung 4.15 Eine PCR basierte *Microarray* Analyse ergab eine Regulierung von *Schlafen-1* (LOC688900), *Ddit3* und *Gpr132-predicted* in rBMSC. Die einzelnen Balken zeigen jeweils die Regulierung der Gene in vier durchgeführten Microarrays in -SOX9 Zellen, kalibriert auf Kontroll-rBMSC. Die Regulierung von *Ddit3* und *Gpr132-predicted* konnte mit dem dritten und vierten Array nicht reproduziert werden.

Von Schlafen-1 weiß man, dass es zu einem Zellzyklusarrest führen kann, indem es die Cyclin D1 Induktion inhibiert (Brady, Boggan et al. 2005). Das lässt die Vermutung zu, dass auch Cyclin D1 durch eine Änderung der Sox9 Menge beeinflusst sein könnte.

Ddit3 wird auch als „CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein“ oder auch CHOP bezeichnet. Es wird als Antwort auf DNA-Schäden aktiviert und kann, wenn nukleär lokalisiert, einen

G1-Arrest hervorrufen. Außerdem kann Ddit3 die Osteoblastendifferenzierung von MSC induzieren und auch eine Beteiligung an der Adipogenese wurde bereits berichtet (Pereira, Delany et al. 2004).

Gpr132-predicted, auch einfach Gpr132 oder G2A genannt, ist der hoch affine Rezeptor von LPC (*Lysophosphatidylcholines*) und kann durch DNA-Schäden oder Stresssignale induziert werden, um den Zellzyklus in der G2/M-Phase zu blockieren (Weng, Fluckiger et al. 1998). Die Transkription von *Gpr132* ist unter anderem abhängig von der Bindung der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und C/EBP β (Murakami, Hashidate et al. 2009).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass wichtige Regulatoren wie Cyclin D1 oder Mitglieder der C/EBP-Familie in die Zellzyklusregulierung via Sox9 involviert sein könnten, was im Folgenden (Abschnitt 4.2.7 und 4.2.8) näher untersucht wurde.

4.9 Der Einfluss von Sox9 auf Cyclin D1 und p21 in rASC und rBMSC

Die Durchführung eines PCR-basierten Zellzyklus *Microarrays* (Abb. 4.15) ergab einen ersten Hinweis auf eine mögliche Regulation von Cyclin D1 durch Schlafen-1 nach Sox9 *Knockdown*. Neben der Cyclin D1 Expression haben wir auch die Expression von CDK4 und p21 in –SOX9 und +SOX9 MSC untersucht.

In Western Blot Analysen konnten wir zeigen, dass eine Inhibition von Sox9 in rBMSC eine Induktion von p21 und von Cyclin D1 zur Folge hat. Die Expression von CDK4 hingegen, einem katalytischen Partner von Cyclin D1, blieb jedoch weitgehend unverändert. +SOX9 rBMSC zeigten umgekehrt ein schwächeres Signal für p21 und Cyclin D1, verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 4.16 A).

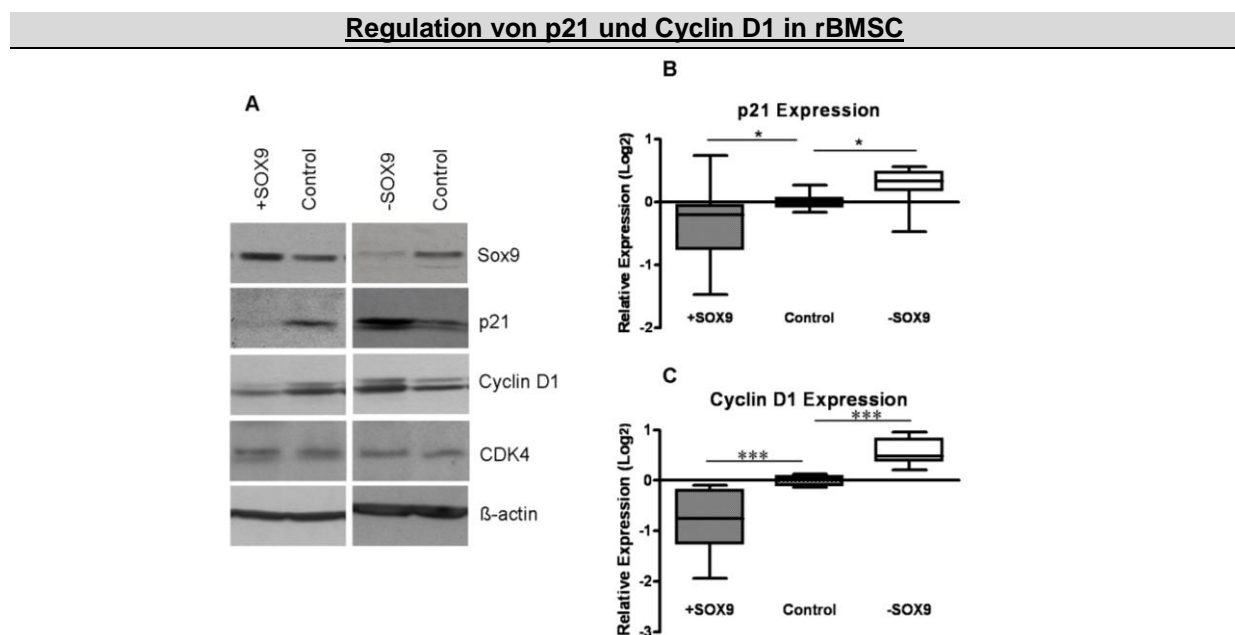
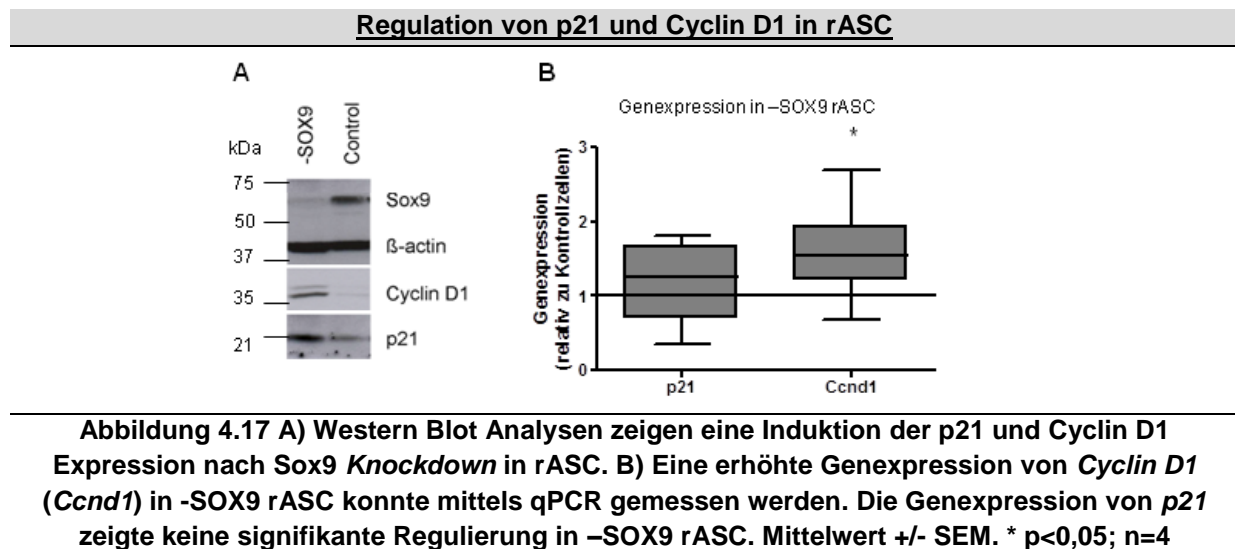


Abbildung 4.16 Western Blot Analysen zeigen eine Inhibition von p21 und Cyclin D1 auf Protein- (A), sowie qPCR Analysen auf RNA-Ebene (B, C) in +SOX9 rBMSC und jeweils eine Induktion in –SOX9 rBMSC. Die CDK4 Proteinmenge ist dabei nicht reguliert (A). Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p<0,05$, *** $p<0,001$; Western Blot $n\geq 5$, qPCR $n\geq 8$;

Ergebnisse

Auch in +SOX9 rBMSC wurde CDK4 nicht reguliert. Analog zu den Western Blot Daten zeigte die Untersuchung der mRNA eine, wenn auch geringe, entsprechende Regulierung von *p21* (Abb. 4.16 B). *Cyclin D1* wurde auf transkriptioneller Ebene stärker beeinflusst. –SOX9 rBMSC zeigten eine Halbierung und +SOX9 eine Verdopplung der *Cyclin D1* mRNA Menge verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.16 C).

Für rASC konnte ebenso eine Regulierung von p21 und Cyclin D1 auf Proteinexpression nach Sox9 *Knockdown* nachgewiesen werden (Abb. 4.17). Auf transkriptioneller Ebene allerdings zeigte sich nur *Cyclin D1* (*Ccnd1*) signifikant erhöht in –SOX9 rASC. Da auch in rBMSC die *p21* Regulierung auf transkriptioneller Ebene großen Schwankungen unterlag (Abb. 4.16 B), kann hier von einem vermutlich post-transkriptionellen Regulierungsmechanismus in MSC durch eine Sox9 Inhibition ausgegangen werden.



Um die Funktion der verstärkten p21 und Cyclin D1 Proteinexpression zu eruieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen in rBMSC durchgeführt, die eine mögliche Änderung der intrazellulären Lokalisation zeigen können. Dabei konnte festgestellt werden, dass in –SOX9 rBMSC p21 hauptsächlich nukleär lokalisiert ist, im Gegensatz zu Kontroll- und +SOX9 rBMSC. Für Cyclin D1 konnte kein Unterschied bezüglich der zellulären Lokalisation (Zytoplasma/Nukleus) ermittelt werden (Abb. 4.18 A), wobei in +SOX9 rBMSC eine relativ große Schwankung der Werte vorlag. Abbildung 4.18 B und C zeigen die zusammengefasste Auswertung von fünf unabhängigen Versuchen.

Immunfluoreszenz für p21 und Cyclin D1 in rBMSC

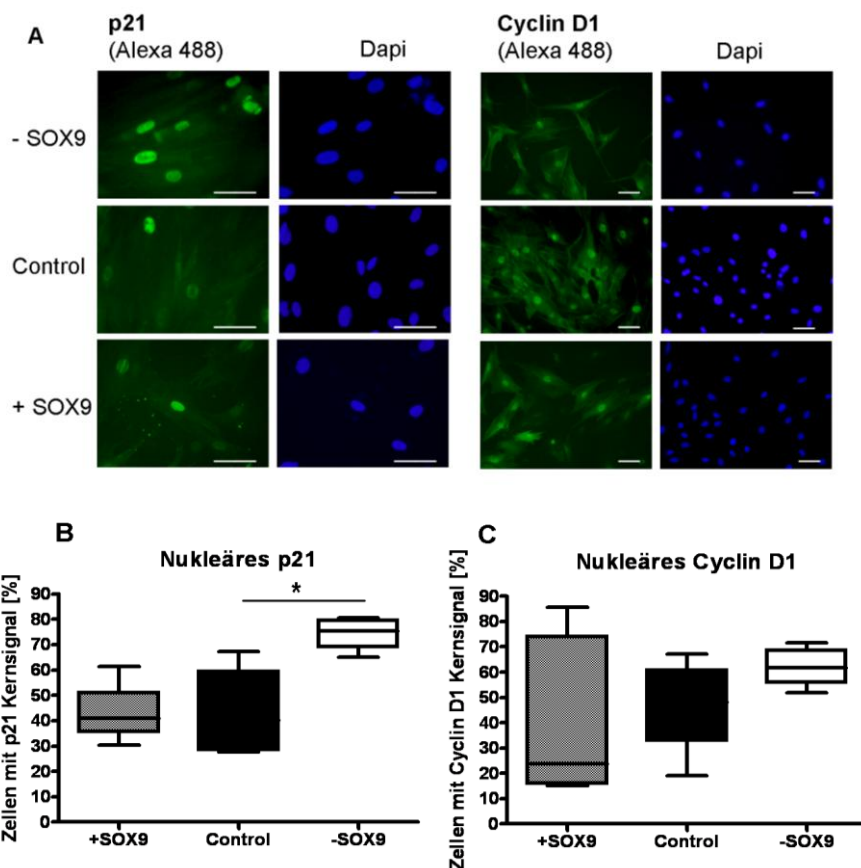


Abbildung 4.18 Nachweis der intrazellulären Lokalisation von p21 und Cyclin D1 mittels Immunfluoreszenz (jeweils links (grün)) und entsprechender DNA Färbung mit DAPI (jeweils rechts (blau)). Es konnte eine Akkumulation von p21 im Kern von –SOX9 Zellen (A und B) festgestellt werden. Für Cyclin D1 ist die Lokalisation in –SOX9 oder +SOX9 Zellen nicht verändert (A und C); Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n=5$; Größenbalken = $100\mu\text{m}$

4.10 Sox9-abhängige Regulierung der adipogenen Differenzierung in rBMSC

Sowohl die Regulierung von zellzyklusspezifischen Proteinen wie p21 und Cyclin D1 nach Sox9 *Knockdown* und Überexpression, wie auch die veränderte Expression verschiedener differenzierungsspezifischer Gene deutet darauf hin, dass Sox9 neben der Zellvitalität auch das Differenzierungspotential von MSC verändern kann. Ein mögliches Bindeglied könnte dabei Cyclin D1 darstellen. Verschiedene Studien schreiben Cyclin D1, neben der Rolle des pro-proliferativen Proteins, auch eine Involvierung in die osteogene (Shen, Wang et al. 2006) und adipogene (Fu, Rao et al. 2005) Differenzierung von MSC zu.

4.10.1 Reduktion der Proteinexpression und Destabilisierung der mRNA von C/EBP β nach SOX9 Knockdown in rBMSC

Da Cyclin D1 auf RNA- und Proteinebene in -SOX9 rBMSC, wie auch in rASC, verstärkt exprimiert wird, die Zellen aber trotzdem langsamer wachsen und der Zellzyklus nicht beschleunigt ist, sondern der S-Phase Eintritt verzögert passiert, spielt die erhöhte Cyclin D1 Expression vermutlich eher eine zellzyklusunabhängige Rolle in MSC. Fu et al. zeigten eine reprimierende Funktion von Cyclin D1 während der frühen adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (Fu, Wang et al. 2004) auf C/EBP β , den Schlüsseltranskriptionsfaktor der Adipogenese.

Abbildung 4.19 zeigt deutlich, dass die drei Isoformen von C/EBP β in Sox9 *Knockdown* rBMSC eine stark reduzierte Proteinexpression aufweisen (Abb. 4.19 A), jedoch keine signifikante Reduktion der C/EBP β Genexpression zeigen (Abb. 4.19 B). Daraus lässt sich ein posttranskriptionaler Regulierungsmechanismus ableiten. Aus diesem Grund wurde die mRNA Stabilität durch Zugabe von Actinomycin D über einen Zeitraum von sechs Stunden in -SOX9, wie auch in Kontrollzellen, analysiert. Während die Menge der C/EBP β mRNA in der Kontrolle erst nach sechs Stunden eine signifikante Abnahme zeigte, war dies in -SOX9 rBMSC bereits nach vier Stunden der Fall. Das konnte reproduzierbar für drei unabhängige Sox9 *Knockdown* Versuche mittels qPCR Analysen gezeigt werden und ist in Abbildung 4.19 C zusammengefasst.

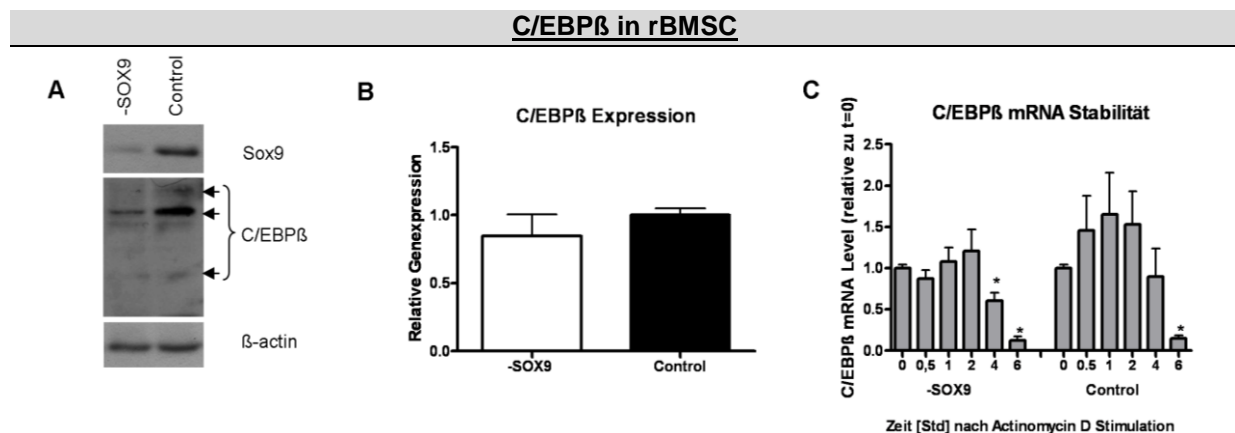


Abbildung 4.19 Western Blot Analysen von C/EBP β zeigen eine starke Reduktion nach Sox9 *Knockdown* (A). Auf RNA Ebene zeigt sich durch entsprechende qPCR Analysen keine Regulation der C/EBP β mRNA (B). Die qPCR-basierte Untersuchung der mRNA Stabilität von C/EBP β , nach Zugabe von Actinomycin D, ergibt einen signifikant schnelleren Abbau in -SOX9 rBMSC verglichen mit Kontrollzellen (C).

Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ mit ungepaartem t-test; $n=3$

4.10.2 Inhibierung der Expression von adipogenen Marker nach Sox9 Knockdown in rBMSC

C/EBP β spielt eine zentrale Rolle bei der Adipogenese. Bereits 1997 wurde von Tanaka et al. gezeigt, dass Mäuse, denen das C/EBP β und C/EBP δ Gen fehlt, eine fehlerhafte Adipozytendifferenzierung aufweisen (Tanaka, Yoshida et al. 1997). Die stark reduzierte C/EBP β Proteinmenge in –SOX9 rBMSC deutet an, dass die adipogene Differenzierungsfähigkeit der Zellen beeinflusst sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde die mRNA Expression von fünf adipogenen Differenzierungsmarkern während drei Wochen adipogener Differenzierung analysiert. Es zeigte sich in den ersten beiden Wochen eine verringerte Expression von PPAR γ , SREBF1, FASN und LPL (letzteres nur nach 14 Tagen) (Abb. 4.20 A). Es scheint also, als ob fehlendes Sox9 das Differenzierungsvermögen von rBMSC zu Adipozyten vor allem in den ersten zwei Wochen, während der frühen Differenzierungsphase, negativ beeinflusst, die vollständige Differenzierung jedoch nicht verhindern kann. Es konnten in –SOX9, wie auch in Kontrollzellen, nach drei Wochen Lipidtröpfchen in den Zellen mit Ölrot O Lösung angefärbt werden, was eine Differenzierung der rBMSC zu Adipozyten beweist (Abb. 4.20 B).

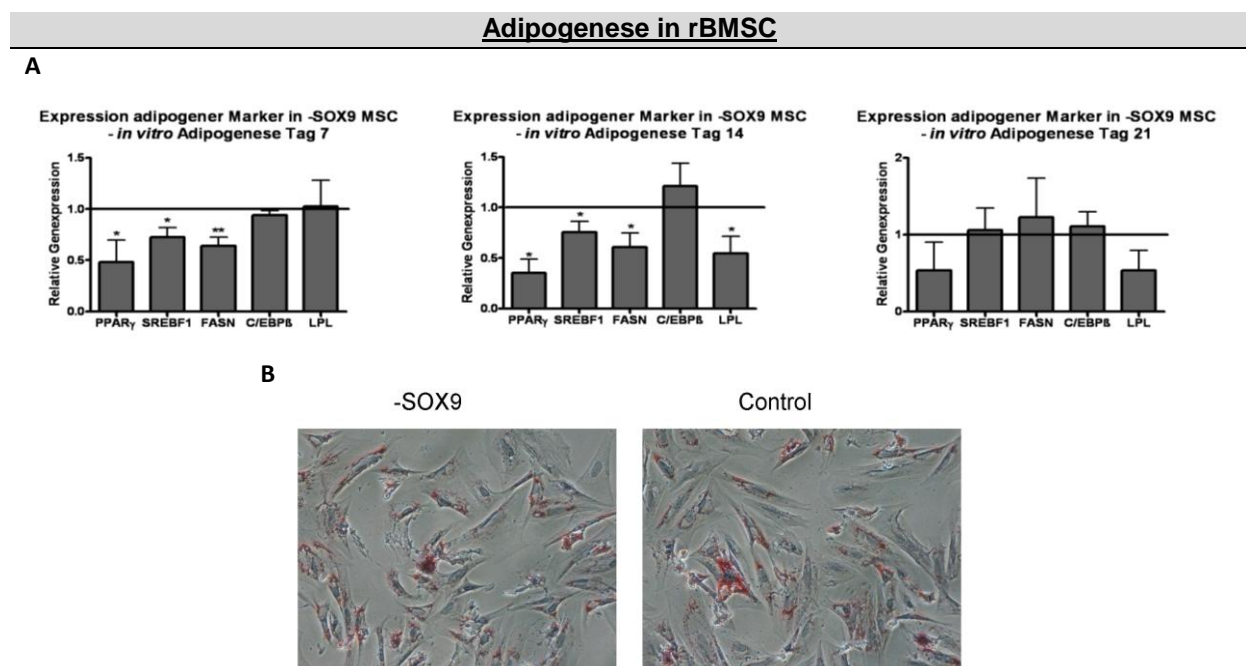


Abbildung 4.20 qPCR Analysen zeigen die Expression adipogener Markergene nach 7, 14 und 21 Tagen der *in vitro* Adipogenese in –SOX9 rBMSC, verglichen mit Kontrollzellen (A). Eine Ölrot O Färbung von Lipidtröpfchen dient als Nachweis der adipogenen Differenzierung. Vergrößerung 100-fach (B); Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 5$;

4.10.3 Cyclin D1-unabhängige C/EBP β Inhibition und Cyclin D1-abhängige Induktion von p21 und Osteocalcin in -SOX9 rBMSC

Da wir vermuteten, dass C/EBP β , wie in der Literatur beschrieben, durch Cyclin D1 blockiert wird, haben wir Cyclin D1 in -SOX9 rBMSC transient inhibiert, um zu untersuchen ob die reduzierte Expression von C/EBP β dadurch wieder induziert werden kann und wieder auf das Expressionslevel der Kontrollzellen ansteigt.

Der siRNA vermittelte Cyclin D1 *Knockdown* (-CCND1) in -SOX9 rBMSC hatte keinen Einfluss auf das C/EBP β Signal in den durchgeführten Western Blot Analysen, allerdings aber auf die Stärke der p21 Proteinexpression (Abb. 4.21 A). Das zeigt, dass in unserem Kontext die Induktion von p21 vom Level der Cyclin D1 Expression abhängt.

Cyclin D1-abhängige Induktion von p21 und Osteocalcin in rBMSC

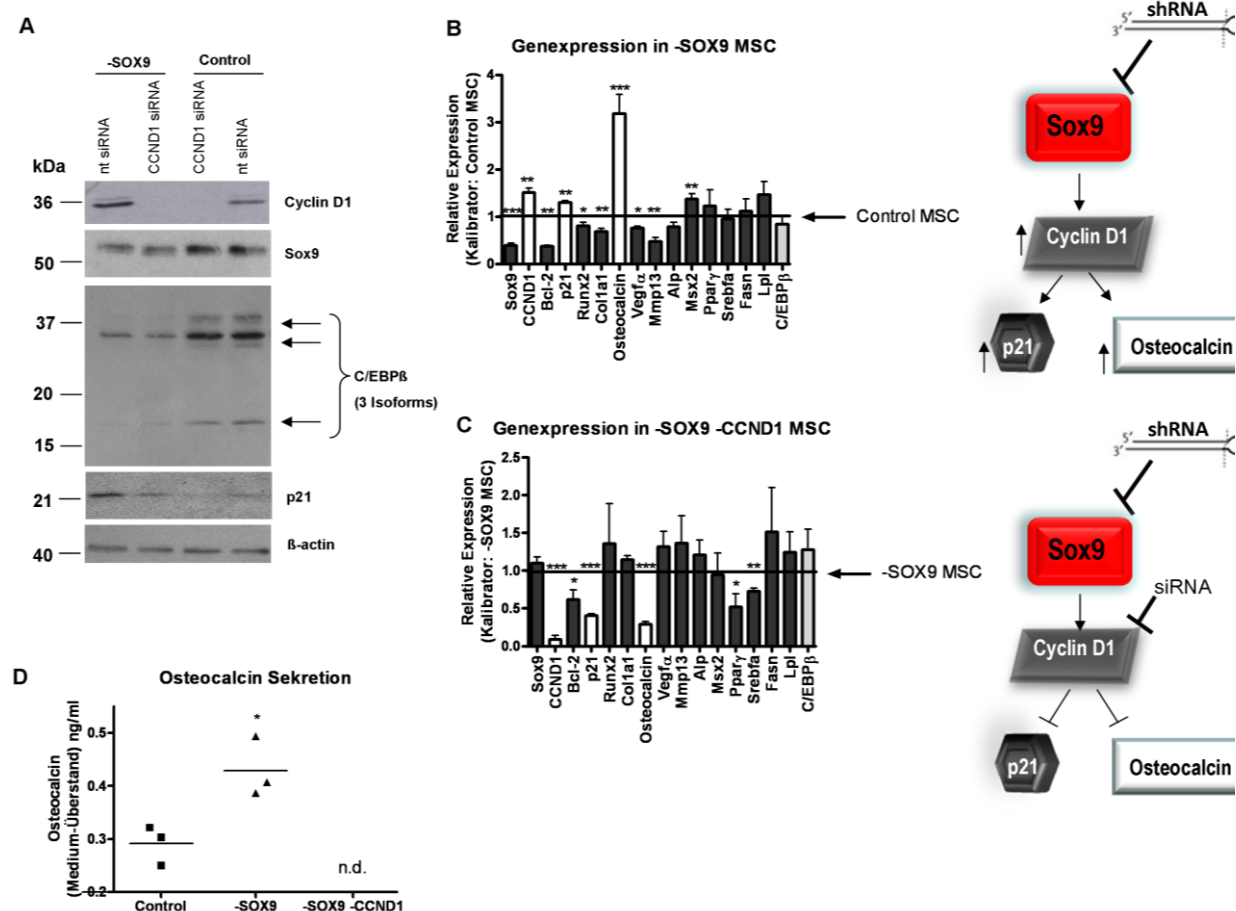


Abbildung 4.21 Western Blot (A) und qPCR Analysen (B, C) zeigen, dass ein transienter *Knockdown* von Cyclin D1 (-CCND1) in -SOX9 rBMSC keinen Einfluss auf die C/EBP β Expression hat (nt siRNA = *non-target* siRNA). Die erhöhte p21 Expression in -SOX9 Zellen wird durch einen zusätzlichen Cyclin D1 *Knockdown* wieder reduziert, was mit Western Blot (A) und qPCR Analysen (B, C) verifiziert wurde. Die erhöhte Osteocalcin mRNA Expression in -SOX9 rBMSC (B) zeigt nach zusätzlicher Cyclin D1 Inhibition ebenfalls eine starke Reduktion (C). Die Osteocalcin Proteinmenge im Medium bestätigt die RNA Daten und war in -SOX9 -CCND1 Zellen nicht mehr nachweisbar (n.d. = nicht detektierbar) (D). Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n=3; ungepaarter t-Test für C) und D);

Zwar konnten wir keine Cyclin D1-abhängige Regulierung von C/EBP β zeigen, vermuten aber trotzdem eine Mediatorrolle von Cyclin D1 in adulten rBMSC bezüglich Zellvitalität und/oder Differenzierungsvermögen. Um die Auswirkungen der verstärkten Cyclin D1 Proteinexpression genauer zu eruieren, haben wir die Expression verschiedener Markergene nach gleichzeitigem Cyclin D1 und Sox9 *Knockdown* untersucht und mit der Expression in Sox9 *Knockdown* Zellen verglichen (Abb. 4.21 B und C). Wir konnten damit *Downstream*-Effekte der Sox9 Inhibition, die durch Cyclin D1 verursacht sind, aufzeigen.

Die Expression von *p21* und *Osteocalcin*, beide Gene zeigen eine Hochreglierung in –SOX9 MSC, war stark inhibiert in –SOX9 –CCND1 rBMSC. Auch auf Proteinebene konnte dies bestätigt werden. Western Blot Analysen zeigten eine Reduktion von p21 (Abb. 4.21 A) und ELISA-basierte Untersuchungen der Osteocalcin Sekretion waren unterhalb des Detektionsminimums von 0,2 ng/ml in –SOX9 –CCND1 Zellen, wohingegen –SOX9 und Kontroll-rBMSC noch nachweisbare Osteocalcinmengen in den Zellkulturüberstand abgaben (Abb. 4.21 D).

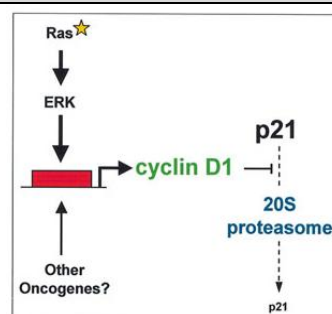
Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Regulierung von Osteocalcin und p21 in -SOX9 rBMSC indirekt, über einen Cyclin D1-abhängigen Mechanismus, passiert. Die C/EBP β Regulierung nach Sox9 *Knockdown* hingegen ist nicht abhängig vom Cyclin D1 Expressionslevel.

4.11 Untersuchung potentieller Signalwege in rBMSC

4.11.1 Die Blockierung von MEK1/2 mittels U0126 hat keinen Einfluss auf die differentielle Expression von Cyclin D1, p21 und C/EBP β

U0126 ist ein nicht-kompetitiver, hoch selektiver Inhibitor von MEK1 und 2 und blockiert somit den Raf/MEK/ERK-Signalweg. RAS ist ein Bestandteil dieses Signalweges, der in Abbildung 4.22 stark vereinfacht dargestellt ist. Man weiß, dass eine Aktivierung von RAS, durch zum Beispiel Wachstumsfaktoren, zu einer Erhöhung von sowohl Cyclin D1 also auch p21 führen kann (Coleman, Marshall et al. 2004).

Aktivierungsschema des MEK/ERK Signalwegs



**High
ERK activity**

Abbildung 4.22 Über ein verstärktes Ras Signal kommt es zu verstärkter Expression von Cyclin D1 was zur Folge hat, dass die Degradation von p21 im Proteasom verhindert wird.
Abbildung aus (Coleman, Marshall et al. 2003)

Ergebnisse

Da beides nach Sox9 Inhibierung in MSC (rBMSC und rASC) beobachtet wurde, könnte dies darauf hin deuten, dass fehlendes Sox9 auf den Raf/MEK/ERK-Signalweg wirkt, um diesen zu aktivieren.

Stimmt diese Hypothese, dass Cyclin D1 und p21 durch Aktivierung dieses Signalweges nach Sox9 *Knockdown* induziert werden, müsste durch eine Blockierung des Raf/MEK/ERK-Weges die Menge der beiden Zellzyklusproteine wieder auf den Level in Kontrollzellen sinken.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde MEK1/2 via UO126 blockiert. Dabei konnte keine Änderung der Cyclin D1 und p21 Expression festgestellt werden. Auch C/EBP β wurde durch die Inhibition nicht beeinflusst. Die phosphorylierte Form von p42/44 (Erk1/2) verschwand durch die Zugabe von UO126, was die Funktionalität des Inhibitors zeigt. Durch diese Experimente kann also für unseren Kontext ausgeschlossen werden, dass Sox9 via RAS auf die Raf/MEK/ERK-Signaltransduktion und damit auf Cyclin D1, p21 und C/EBP β wirkt (Abb. 4.23).

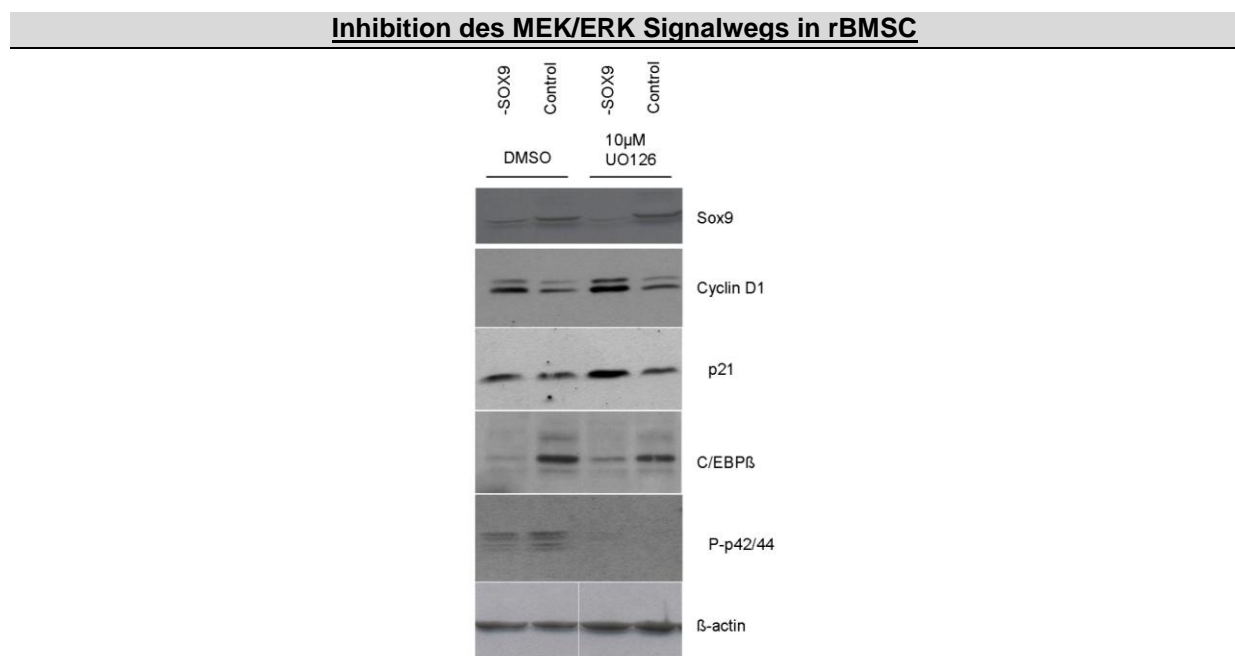


Abbildung 4.23 Western Blot Analysen zeigen, dass durch die Inhibition des MEK/ERK-Signalwegs via UO126 die differentielle Expression von Cyclin D1, p21 und C/EBP β nicht reguliert wird. Das Verschwinden von P-p42/p44 (ERK1/2) zeigt die Funktionalität des Inhibitors. n=3

4.11.2 Die Untersuchung zentraler Proteine verschiedener Signalwege ergibt keine reproduzierbare Regulierung

Mittels Western Blot Analysen wurden außerdem zentrale Proteine verschiedener Signalwege, die in MSC aktiviert sind, und deren Phosphorylierungszustand in -SOX9 sowie in +SOX9 rBMSC untersucht. Darunter waren GSK3 β , β -Catenin, AKT und c-Myc. Es zeigte sich keine reproduzierbare Regulation dieser Moleküle. Repräsentative Western Blots sind in Abbildung 4.24 gezeigt.

Zentrale Proteine verschiedener Signalwege in rBMSC

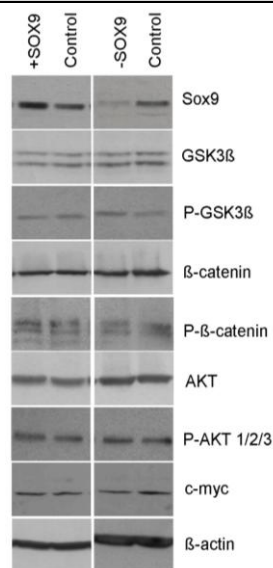


Abbildung 4.24 Zentrale Proteine verschiedener, in MSC aktiver Signalwege und deren phosphorylierte Formen wurden mittels Western Blot Analysen in –SOX9 und +SOX9 rBMSC untersucht. Dabei konnte keine reproduzierbare Regulierung gezeigt werden. n≥3

4.11.3 Eine verminderte Aktivierung der p38 MAPK Signalkaskade nach Sox9 *Knockdown* führt zu stabilisiertem Cyclin D1 Protein

Eine Aktivierung (Phosphorylierung) der p38 MAPK führt unter anderem zu einer Phosphorylierung von Cyclin D1 und anschließender Degradierung im Proteasom (Alao 2007). Um zu ermitteln ob die Stabilität von Cyclin D1 durch Änderung der Sox9-Dosis reguliert wird, haben wir die Degradierung von Cyclin D1 über einen Zeitraum von sechs Stunden nach Zugabe von Cycloheximid D beobachtet. Gleichzeitig wurde p38 und phospho-p38 mittels Western Blot Analysen untersucht, um eine potentielle Beteiligung dieses Signalwegs festzustellen.

In –SOX9 rBMSC war Cyclin D1 deutlich länger nachzuweisen als in Kontroll- und +SOX9 Zellen (Abb. 4.25 A, B). Densitometrische Auswertungen der Western Blot Analysen zeigten, dass in Sox9 *Knockdown* Zellen erst nach zwei Stunden eine signifikante Reduktion der Cyclin D1 Proteinmenge, bezogen auf die Ausgangsmenge, messbar war. In Kontroll- und +SOX9 rBMSC hingegen war bereits nach 30 Minuten signifikant weniger Cyclin D1 Protein vorhanden, was auf eine Stabilisierung von Cyclin D1 in Sox9 *Knockdown* Zellen schließen lässt (Abb. 4.25 B). P38 und phospho-p38 wurden daraufhin ebenfalls mittels spezifischer Antikörper detektiert, densitometrisch vermessen und der Quotient aus phospho-p38/p38 gebildet (Abb. 4.25 A, C). Dieser stieg in Kontroll- und +SOX9 Zellen während der Cycloheximid Behandlung deutlich an, während kaum eine Änderung in –Sox9 Zellen zu messen war. Es konnte nur eine schwache p38-vermittelte Reaktion auf den Stressstimulus in *Knockdown* Zellen detektiert werden, während Kontroll- und +SOX9 Zellen mit verstärkter Aktivierung von p38 antworteten. Folglich ist die fehlende Aktivierung des p38-Signalweges vermutlich der Grund für den verzögerten Abbau von Cyclin D1 in –SOX9 rBMSC und somit für die gemessene, erhöhte Proteinmenge an Cyclin D1 in diesen Zellen.

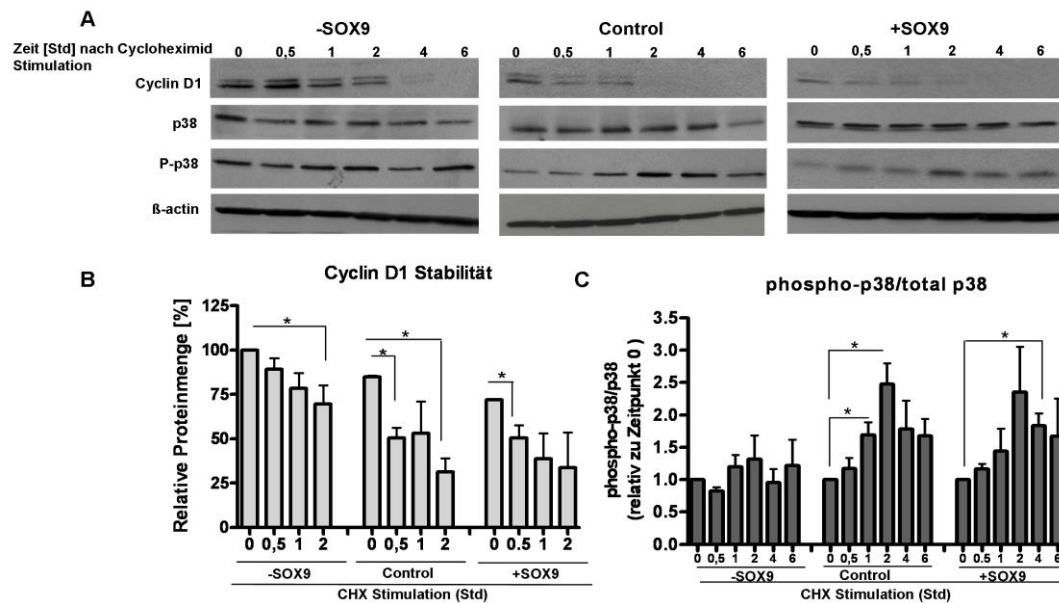
p38 vermittelte Stabilisierung von Cyclin D1 in rBMSC

Abbildung 4.25 Western Blot Analysen zeigen nach Zugabe von Cycloheximid, dass es zu einem verzögerten Abbau von Cyclin D1 in -SOX9 rBMSC im Vergleich zu Kontroll- und +SOX9 Zellen kommt (A). Eine densitometrische Auswertung der Western Blot Signale ergibt, dass in -SOX9 Zellen erst zwei Stunden nach Cycloheximidzugabe ($t=0$) signifikant weniger Cyclin D1 gemessen werden kann. Dies war in Kontroll- und +SOX9 rBMSC bereits nach 30 Minuten der Fall (B). In -SOX9 Zellen kommt es dabei zu keinem Anstieg des phospho-p38/total-p38 (p-p38/p38) Verhältnis. In Kontroll- und +SOX9 Zellen war hingegen ein deutlicher Anstieg des p-p38/p38 Verhältnisses und somit eine Aktivierung nach etwa ein bis zwei Stunden detektierbar (C).

Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ungepaartem t-test; $n=3$;

4.12 Die Rolle von Sox9 während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung

Wie bereits gezeigt, führt eine Inhibition von Sox9 zu einer reduzierten Expression von adipogenen Markergenen in der frühen *in vitro* Adipogenese (Abb. 4.20).

Als wichtiger Transkriptionsfaktor in undifferenzierten MSC, wie auch in Osteoprogenitorzellen, ist es naheliegend, dass eine Veränderung der Sox9-Dosis zu Änderungen im Verlauf der Differenzierung, beziehungsweise im Differenzierungspotential allgemein, führen könnte. Wir konnten zeigen, dass in -SOX9 Zellen verstärkt Osteocalcin und Cyclin D1, letzteres p38-vermittelt, exprimiert wird, allerdings zum Beispiel die *Runx2* Expression leicht inhibiert ist. Somit stellt sich nach der adipogenen Differenzierung auch die Frage, ob das osteogene und chondrogene Differenzierungspotential ebenso verändert ist.

Um das genauer zu untersuchen, wurden +SOX9, Kontroll- und -SOX9 MSC für 3 Wochen osteogen, beziehungsweise chondrogen, differenziert und die Expression verschiedener Marker analysiert sowie histologische Färbungen zur Kontrolle der Differenzierung durchgeführt, wie in Abbildung 4.26 schematisch gezeigt wird.

Chondrogene und osteogene *in vitro* Differenzierung

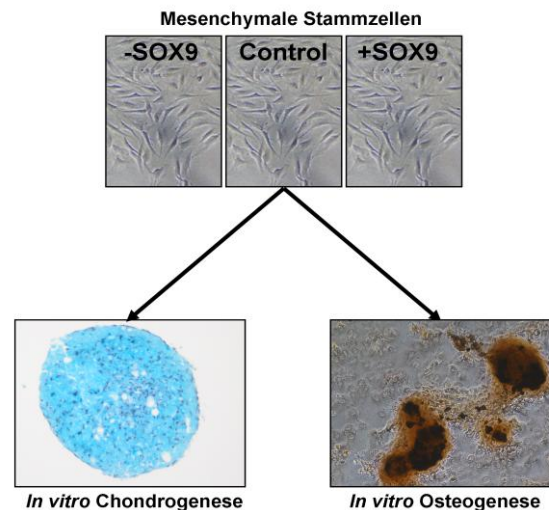


Abbildung 4.26 +SOX9, -SOX9 und Kontroll-MSC wurden chondrogen und osteogen differenziert und molekularbiologisch sowie histologisch ausgewertet. Um die *in vitro* Chondrogenese von rBMSC zu untersuchen, wurde die ECM der 3D-Aggregate mit Alcianblau gefärbt (Beispielbild links) und für die Untersuchung der *in vitro* Osteogenese von rBMSC und rASC die kalzifizierte Matrix mit Alizarinrot S gefärbt (Beispielbild rechts). Die Fotos zeigen Beispielbilder im Durchlichtmikroskop fotografiert.

Es war außerdem von Interesse, ob genetisch manipulierte MSC nach Virustransduktion und insgesamt vier bis fünf Passagen noch ausreichend osteogenes oder chondrogenes Differenzierungspotential besitzen.

4.12.1 Osteogenese

4.12.1.1 Verstärkte Expression osteogener Marker während der *in vitro* Osteogenese in -SOX9 rBMSC und rASC

Durch Zugabe von speziellen Mediumzusätzen (siehe 3.1.2.1) wurde die osteogene Differenzierung in -SOX9, +SOX9 und Kontroll-rBMSC induziert. An Tag 7, 14 und 21 wurde die Expression osteogener Marker untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem nach zwei Wochen -SOX9 rBMSC eine deutlich höhere Expression von *Runx2*, *Osteocalcin*, *Vegfa* und *Mmp13* aufwiesen, während *Alp*, *Msx2* und *Dlx5* reduziert waren. -SOX9 rBMSC zeigten also vor allem in der mittleren Phase der Differenzierung eine erhöhte Expression typischer Osteogenesemarker, verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 4.27).

Wird Sox9 überexprimiert, zeigten sich überraschenderweise nur wenige Veränderungen der Genexpression. Nach 7 und 14 Tagen wird die Expression von *Runx2*, dem Master Transkriptionsfaktor für die osteogene Differenzierung, durch die erhöhte Menge von Sox9 unterdrückt, was sich aber nach 21 Tagen wieder zu relativieren scheint.

Für *Osteocalcin* wurde in +SOX9 rBMSC nach 7 Tagen Differenzierung eine Hochregulierung gezeigt, wohingegen an Tag 14 und 21 eine leicht reduzierte Expression zu sehen war (Abb. 4.27). Eine starke Induktion der *Mmp13* Expression konnte darüber hinaus an Tag 7 noch gemessen werden, an Tag 14 und 21 jedoch keine Regulierung mehr festgestellt werden.

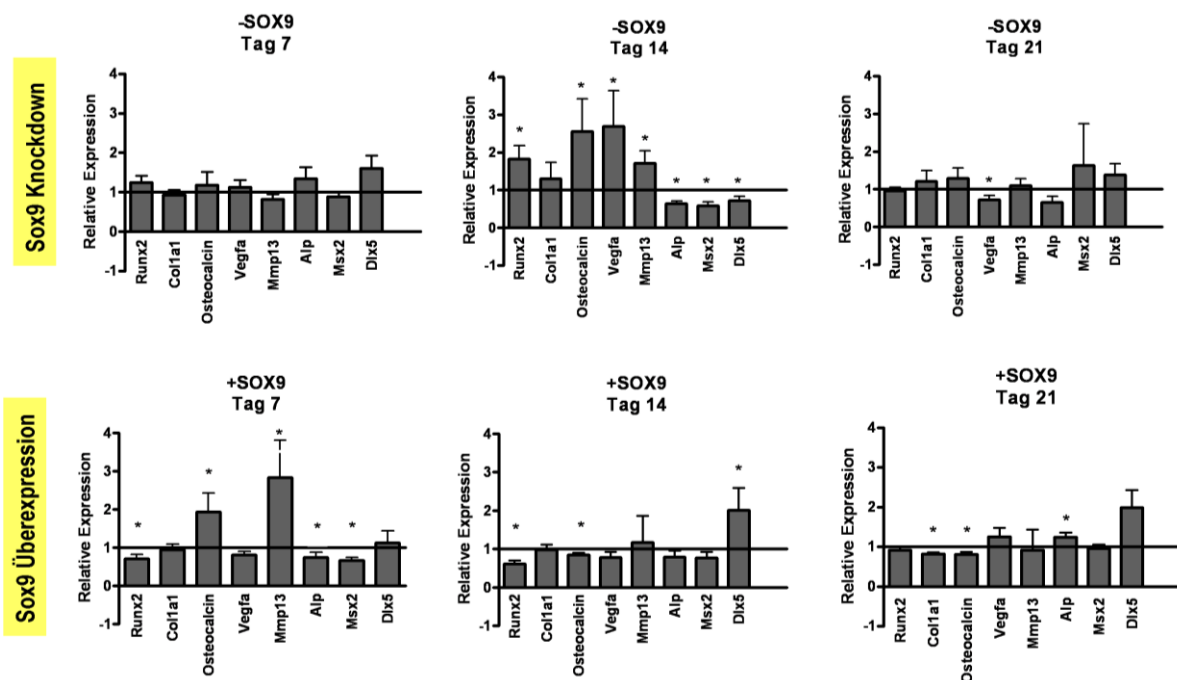
***In vitro* Osteogenese in rBMSC - Genexpression**

Abbildung 4.27 qPCR Analysen zeigen die Expression verschiedener osteogener Marker an Tag 7, 14 und 21 der *in vitro* Osteogenese für –SOX9 und +SOX9 rBMSC, jeweils bezogen auf Kontrollzellen. Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n \geq 6$

Wurden –SOX9 rASC einem osteogenen Stimulus ausgesetzt, konnte nach 14 Tagen eine erhöhte Expression von *Osteocalcin* gemessen werden, sowie nach 21 Tagen eine Erhöhung der *Vegfa* und *Mmp13* mRNA Expression (Abb. 4.28).

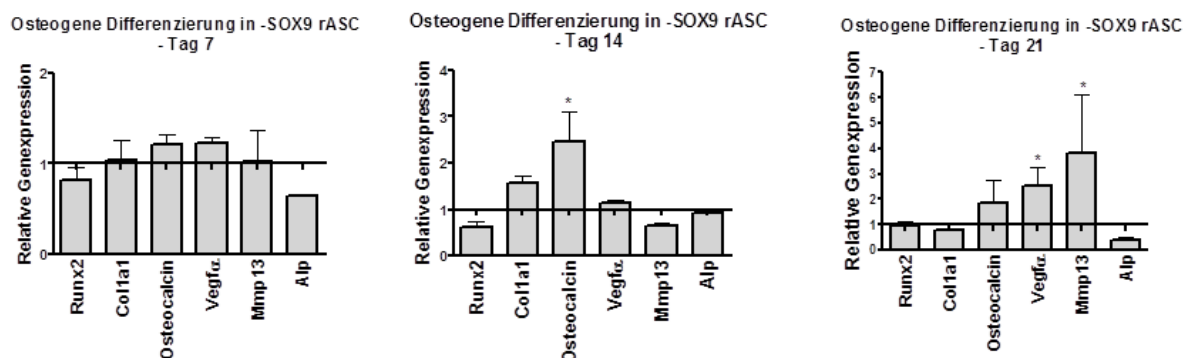
***In vitro* Osteogenese in rASC - Genexpression**

Abbildung 4.28 qPCR Analysen zeigen die Expression verschiedener osteogener Marker an Tag 7, 14 und 21 der *in vitro* Osteogenese für –SOX9 rASC, jeweils bezogen auf Kontrollzellen. Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n = 4$

Eine Inhibition von Sox9 beeinflusst also in rBMSC, wie auch in rASC, die Expression osteogener Marker. In beiden Zelltypen kommt es zu einer Verstärkung der *Osteocalcin* Expression an Tag 14

nach Sox9 *Knockdown*. Auch in undifferenzierten rBMSC und rASC konnte bereits eine Erhöhung des Osteocalcin-Levels nach Sox9 *Knockdown* gemessen werden (Abb.4.6 und 4.7).

4.12.1.2 Verstärkte Mineralisierung während der *in vitro* Osteogenese in –SOX9 rASC und tendenziell in rBMSC

Durch Anfärben der mineralisierten Matrix mittels Alizarinrot S konnte die Differenzierung der rBMSC anhand der Kalzifizierung visualisiert werden (Abb. 4.29 A). Morphometrische Auswertungen der gefärbten Areale zeigten einen Trend zu verstärkter Mineralisierung in –SOX9 rBMSC gemessen an der Fläche (Abb. 4.29 B). Der Unterschied zwischen +SOX9, Kontroll- und –SOX9 Zellen war jedoch nicht signifikant, was unter anderem an der hohen Variabilität der Mineralisierung in den einzelnen Versuchen lag. Die repräsentativen Bilder in Abbildung 4.29 A zeigen allerdings, dass es einen Unterschied hinsichtlich der gebildeten Matrixstruktur gab. +SOX9 Zellen bildeten vor allem viele einzelne, kleine Nodules, wohingegen in –SOX9 rBMSC nach 3 Wochen osteogener Differenzierung, eine stark vernetzte Matrixstruktur zu finden war.

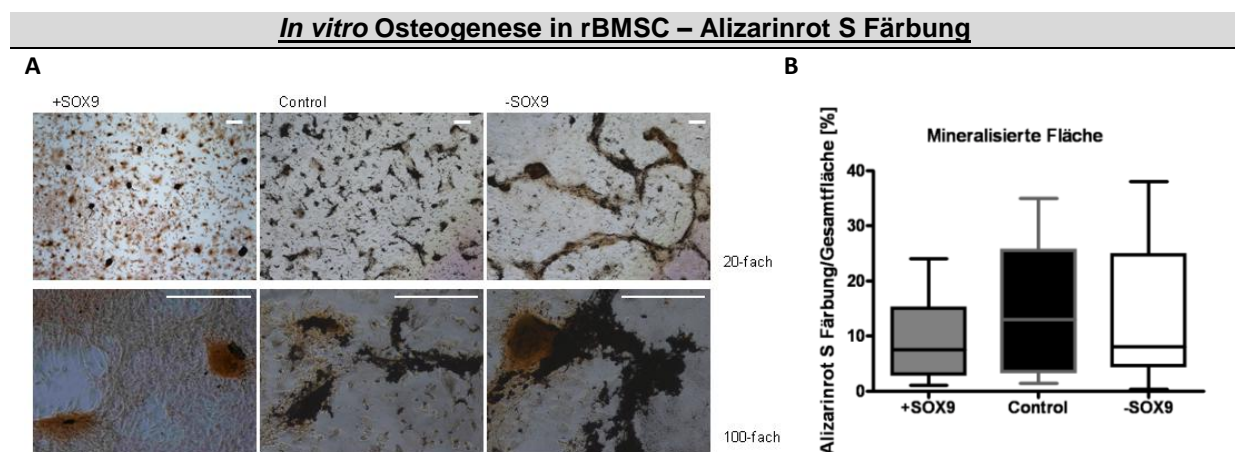


Abbildung 4.29 Calcium-Färbung von rBMSC mit Alizarinrot S. A) Repräsentative Fotos von Alizarinrot S gefärbten +SOX9, Kontroll- und –SOX9 rBMSC nach 21 Tagen *in vitro* Osteogenese, in 20- und 100-facher Vergrößerung eines Durchlichtmikroskops, zeigen unterschiedliche Matrixstruktur. Morphometrische Auswertungen der gefärbten Areale ergeben keinen signifikanten Unterschied (B). $n \geq 6$; Größenbalken = 500 μm ;

Die repräsentativen Fotos in Abbildung 4.30 A zeigen Alizarinrot S Färbungen von osteogen differenzierten rASC. Für –SOX9 rASC konnte ein signifikant größeres mineralisiertes Areal nachgewiesen werden nach 21 Tagen osteogener Differenzierung (Abb. 4.30 B).

Es kam grundsätzlich zu einer geringeren Calcium-Einlagerung mit deutlich kleineren Nodules in rASC verglichen mit rBMSC (vergleich Abbildung 4.29 A und 4.30 A), allerdings waren die interexperimentellen Schwankungen geringer während der *in vitro* Osteogenese in rASC im Vergleich zu rBMSC.

***In vitro* Osteogenese in rASC – Alizarinrot S Färbung**

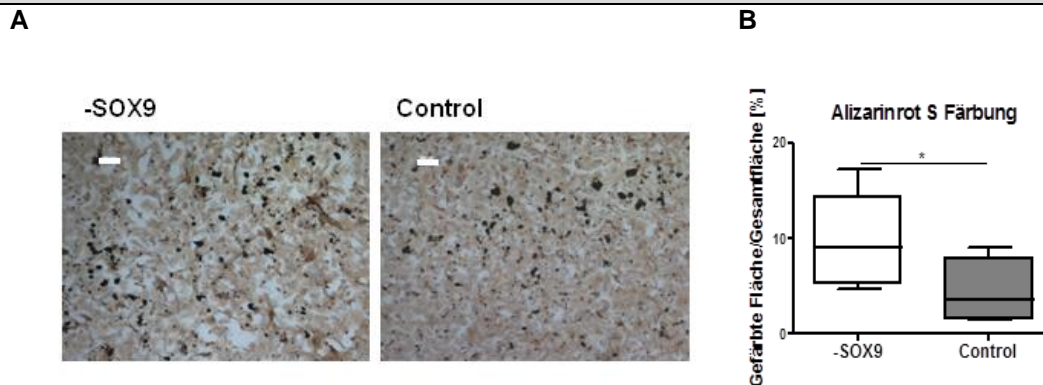


Abbildung 4.30 Calcium-Färbung von rASC mit Alizarinrot S. A) Repräsentative Fotos von Alizarinrot S gefärbten Kontroll- und -SOX9 rASC nach 21 Tagen *in vitro* Osteogenese in 20-facher Vergrößerung eines Durchlichtmikroskops. (B) Morphometrische Auswertungen der gefärbten Areale ergeben signifikant mehr gefärbte Fläche in -SOX9 rASC (B). Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n = 5$; Größenbalken = 200 μm

Man kann daher postulieren, dass eine Inhibition von Sox9 in rASC, wie auch in rBMSC, eine positive Wirkung auf die Mineralisierung der Zellen zu haben scheint sowie die Expression von bestimmten osteogenen Marker positiv beeinflusst.

4.12.1.3 Beschleunigter Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität während der Osteogenese in -SOX9 rBMSC

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, ein Enzym, welches als charakteristisch für Osteoblasten beschrieben ist, kann einen Rückschluss auf den Grad der Differenzierung von Stammzellen zu Knochenzellen geben. Es wurde zwar weder an Tag 7, 14 noch 21 ein signifikanter Unterschied zwischen der absoluten Aktivität in -SOX9, +SOX9 und Kontroll-rBMSC gefunden (Abb. 4.31 A), in Abbildung 4.31 B ist allerdings zu sehen, dass in -SOX9 Zellen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase von Tag 7 bis zu Tag 21 rasch zunimmt, während in Kontroll- und +SOX9 Zellen an Tag 14 sogar eine leichte Abnahme der Aktivität, bezogen auf Tag 7, gemessen wurde (Diagramm 4.31 B ohne Standardabweichung gezeigt). Dies unterstützt die Daten der Genexpression, in denen an Tag 14 die stärkste Regulierung der Alkalischen Phosphatase gefunden werden konnte. In Kontroll-rBMSC steigt die Aktivität allerdings nach Tag 14 stark an, sodass an Tag 21 der gleiche Level erreicht wird wie in -SOX9 rBMSC (Abb. 4.31 B). Es handelt sich also möglicherweise um einen leichten „Vorsprung“ der -SOX9 Zellen, der sich nach 21 Tagen wieder relativiert hat. Sox9 Überexpressions-rBMSC wiesen nach 3 Wochen weniger Alkalische Phosphatase Aktivität auf, was eine Verzögerung beziehungsweise Behinderung der osteogenen Differenzierung in diesen Zellen andeutet.

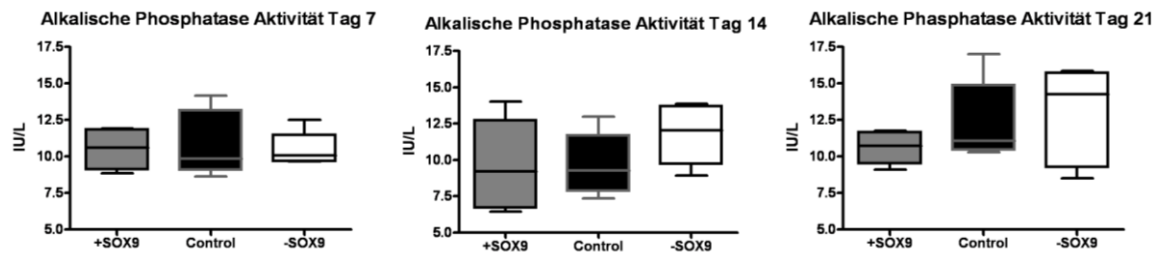
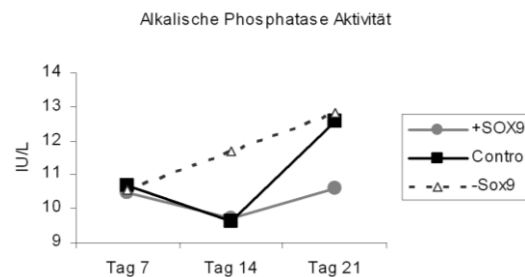
In vitro* Osteogenese in rBMSC – Alkalische Phosphatase Aktivität*A****B**

Abbildung 4.31 Die kolorimetrische Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität zeigt keinen signifikanten Unterschied an Tag 7, 14 oder 21 der osteogen differenzierten rBMSC (A), allerdings im Verlauf eine raschere Zunahme der Aktivität in –SOX9 Zellen (B).

IU=Internationale Enzymeinheit; n≥6

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse also eine veränderte Expression osteogener Marker, eine veränderte Mineralisierung und eine schnellere Zunahme der Alkalischen Phosphatase Aktivität im Vergleich zur Kontrolle während der osteogenen Differenzierung *in vitro* als Konsequenz einer Sox9 Inhibition.

Die Sox9-Dosis beeinflusst sowohl in rBMSC wie auch in rASC den Verlauf der osteogenen Differenzierung, wobei erwähnt werden sollte, dass rBMSC, vermutlich auf Grund ihres Gewebeursprungs, eine stärkere Matrixmineralisierung während der Osteogenese aufweisen.

4.12.2 Chondrogenese in rBMSC

Für die Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotentials wurden –SOX9, +SOX9 und Kontroll-rBMSC in einem 3D-Kultur-Modell (Aggregate, auch als Micromass Pellets bezeichnet) zu Chondrozyten differenziert. Die Kultivierung fand ohne *scaffolds*, also zusätzlich stützende Strukturen, statt und es wurden dabei die Folgen einer Sox9-Dosis Änderung unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen auf die Qualität der Aggregate und auf die Änderung der Genexpression *in vitro* analysiert.

Je 200.000 Zellen wurden zu einem Aggregat vereinigt und unter Zugabe von TGF-β3 für 14 Tage differenziert. Anschließend wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt und unter hypertrophen (Zugabe von Trijodthyronin (T3)), beziehungsweise chondrogenen (Zugabe von TGF-β3) Bedingungen für weitere zwei Wochen kultiviert, wie es schematisch in Abbildung 4.32 gezeigt ist. Um

die Differenzierung zu quantifizieren, wurden die Aggregate vermessen, morphologisch mittels Punktevergabe bewertet, anhand histologischer Färbungen (Alcianblau) die ECM-Synthese visualisiert und die Expression von Markergenen analysiert.

Schema der chondrogenen Differenzierung von rBMSC

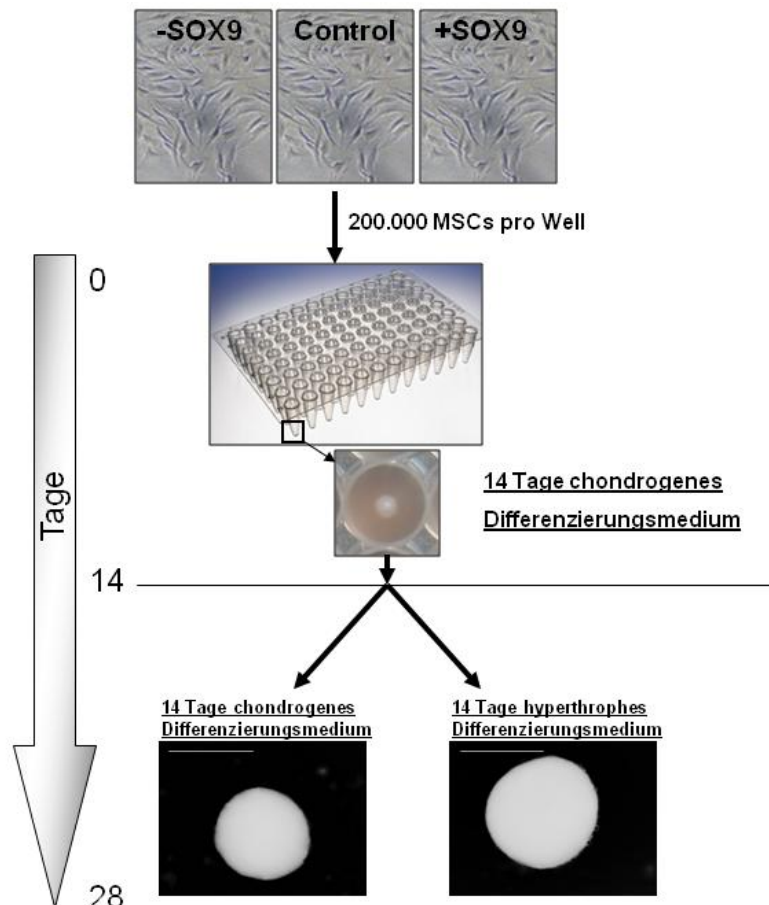


Abbildung 4.32 Schema der chondrogenen Differenzierung. Nach 14 Tagen chondrogener Differenzierung mittels TGF- β 3-haltigem Medium werden die rBMSC-Aggregate in zwei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhält dabei weiterhin TGF- β 3-haltiges (chondrogenes) Medium, die andere Gruppe hypertrophes Differenzierungsmedium, welches Trijodthyronin (T3) anstelle von TGF β 3 enthält. An Tag 28 werden die Aggregate vermessen, morphologisch durch Punktevergabe bewertet, RNA für Genexpressionsanalysen isoliert und für histologische Färbungen fixiert. Größenbalken = 500 μ m; Schema modifiziert nach (Mueller and Tuan 2008).

4.12.2.1 Expression chondrogener Marker in rBMSC

Während der Differenzierung von MSC zu Chondrozyten muss eine Vielzahl von Genen aktiviert werden, um die nötigen zellbiologischen und morphologischen Änderung einzuleiten. COMP, Aggrecan sowie verschiedene Kollagene spielen dabei als Strukturmoleküle der ECM eine entscheidende Rolle.

Vor allem für *COMP* wurde in den mRNA Analysen deutlich, dass bereits nach 2 Wochen Differenzierungsstimulus durch eine Überexpression von Sox9 eine im Schnitt 3-fach erhöhte Expression zu finden ist. –SOX9 rBMSC zeigten hingegen eine signifikant geringere *COMP* Expression an Tag 14. Ein ähnlicher Trend war für *Col2a1* und *Acan* (Aggrecan) zu diesem Zeitpunkt zu sehen. Für beide wurde eine tendenziell erhöhte Genexpression in +SOX9 rBMSC gemessen.

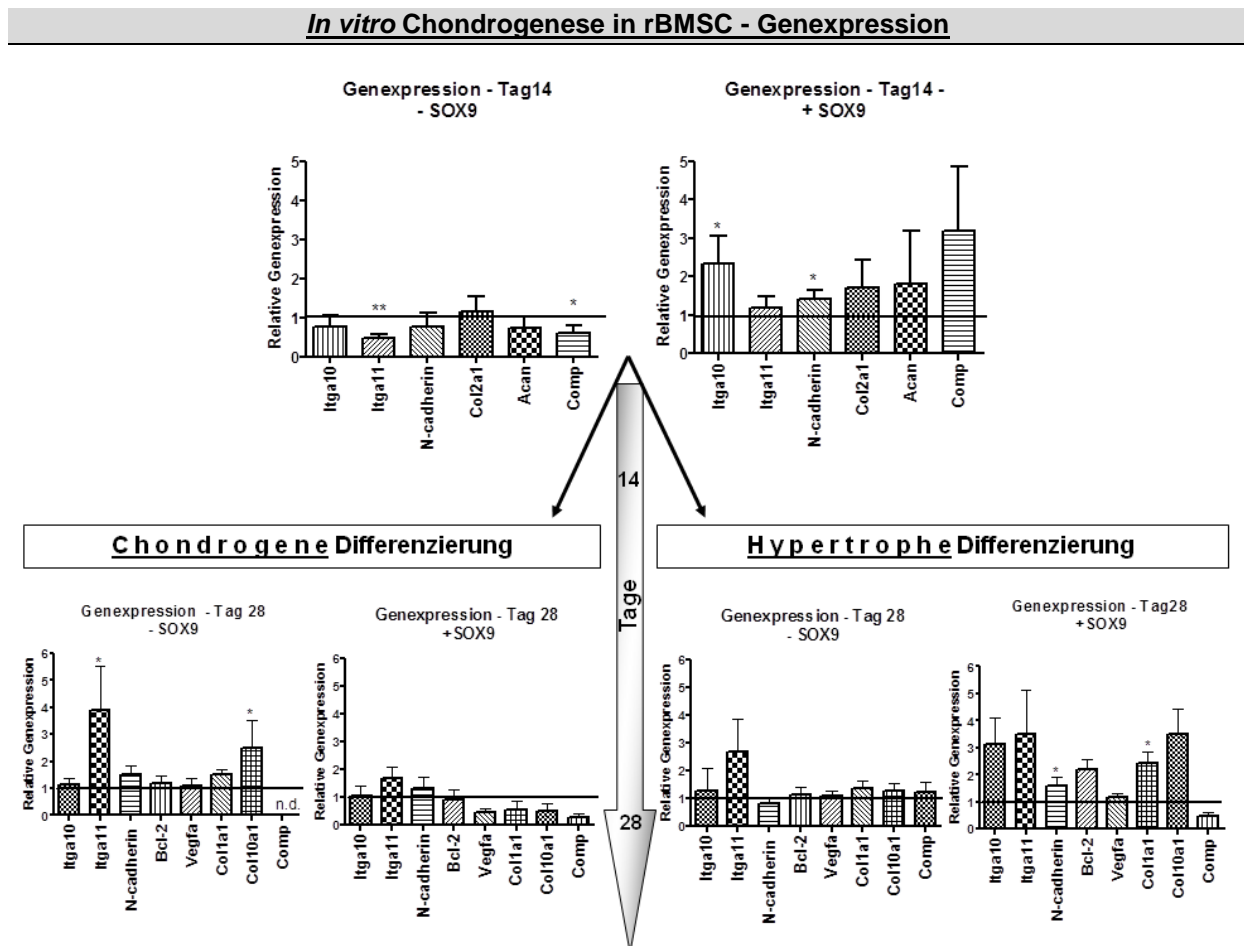


Abbildung 4.33 qPCR Analysen zeigen die Expression verschiedener Marker nach 14 Tagen chondrogener Differenzierung in –SOX9 und +SOX9 rBMSC, bezogen auf die jeweilige Kontrolle. Für weitere 14 Tage wurde ein Teil der Aggregate weiter mit chondrogenem (links) und der andere Teil mit hypertrophem (rechts) Medium kultiviert. Es wird die Genexpression für –SOX9 und +SOX9 rBMSC unter den jeweiligen Bedingungen an Tag 28 gezeigt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; $n = 3-6$; ungepaarter t-Test;

Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle Integrin alpha 10 (*Itga10*) und 11 (*Itga11*) und N-cadherin war durch eine veränderte Sox9-Dosis an Tag 14 beeinflusst. Eine erhöhte mRNA Menge der drei Gene konnte in +SOX9 rBMSC gemessen werden (signifikant nur für *Itga10* und *N-cadherin*), wohingegen –SOX9 Zellen eine Reduktion dieser Gene zeigten (signifikant für *Itga11*). Dies lässt vermuten, dass die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion durch eine erhöhte Sox9 Expression verbessert ist.

Nach weiteren zwei Wochen chondrogener Differenzierung hatte sich dieser Effekt allerdings umgedreht. An Tag 28 war die *Itga10* Expression stark angestiegen in –SOX9 Zellen, genau wie die

Ergebnisse

Col10a1 Expression. Wird Sox9 zu diesem Zeitpunkt überexprimiert, wird die *Col10a1* Expression tendenziell unterdrückt, genau wie *Col1a1*, *Vegfa* und *COMP*.

Eine Voraussetzung für die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten im Verlauf der enchondralen Ossifikation ist ein Abschalten der Sox9 Expression. Daher ist es denkbar, dass auch -SOX9 rBMSC schneller in einen hypertrophen Zustand übergehen, beziehungsweise, dass in +SOX9 rBMSC die Hypertrophie verhindert oder verzögert werden kann. Dies konnte auf transkriptioneller Ebene nicht gezeigt werden. Nach 14 Tagen hypertropher Kultivierung (im Anschluss an 14 Tagen chondrogener Kultivierung) konnte kein Unterschied in der Genexpression zwischen -SOX9 und Kontrollzellen detektiert werden. +SOX9 Zellen zeigten eine Induktion von *N-cadherin*, *Col1a1* und *Col10a1*, wohingegen *COMP* reduziert exprimiert wurde. Es gibt also vorläufig keine Hinweise, dass auf transkriptioneller Ebene die Hypertrophie in differenzierten MSC durch Sox9 verzögert wird (Abb.4.33).

4.12.2.2 Größenmessung der Aggregate und Bewertung der Morphologie (Scoring) in rBMSC

Die Vermessung der Aggregatdurchmesser und die morphologische Bewertung lassen vermuten, dass die Bildung und molekulare Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix von der Sox9-Dosis betroffen sein könnte.

Die Morphologie der rBMSC-Aggregate wird dabei mit einem Punkte-Scoring von 1 bis 4 ausschließlich anhand der äußeren Erscheinung bewertet, wie es in Abbildung 4.34 gezeigt ist. Daneben wurden die Durchmesser der Aggregate nach 14 und 28 Tagen Kulturzeit unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen vermessen und ausgewertet (Abb. 4.35).

Morphologisches Scoring der rBMSC-Aggregate

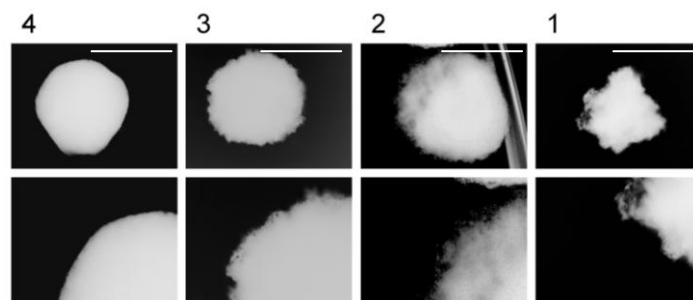


Abbildung 4.34 Bewertung der Aggregatmorphologie. Maximal konnten 4 Punkte für Aggregate mit kompaktem Erscheinungsbild, ohne ausgefranzte Ränder und ohne durchscheinende Areale, vergeben werden. Repräsentative Fotos der rBMSC-Aggregate in der Übersicht und im Detailausschnitt. Größenbalken = 500µm

Nach zweiwöchiger Kulturzeit war bereits ein deutlicher Unterschied in der makroskopischen Morphologie, sowie im Durchmesser zu sehen. Fehlt ein Teil der „normalen“ Sox9-Dosis, ist die Morphologie stark beeinträchtigt und der Durchmesser gleichzeitig größer im Vergleich zu den

Kontrollaggregaten, was auf eine sehr lockere und wenig kompakte ECM-Struktur schließen lässt. Wurde Sox9 überexprimiert, verbesserte sich die Morphologie tendenziell und auch die Länge des Durchmessers stieg signifikant an. Die +SOX9-Aggregate waren bei gleicher makroskopischer Qualität tatsächlich größer, produzieren also vermutlich mehr ECM-Proteine als die Kontroll-Aggregate (Abb. 4.35).

Unter chondrogenen Bedingungen verbessert sich die ungenügende Qualität der –SOX9-Aggregate zu keinem Zeitpunkt, was sich in der Verschlechterung der Morphologie und einem vergrößerten Durchmesser zeigte. Wie vermutet scheinen –SOX9-Aggregate allerdings einen Vorteil unter hypertrophen Bedingungen zu haben. Bei gleicher morphologischer Bewertung zeigen sie einen erhöhten Durchmesser, was die Hypothese stützt, dass die hypertrophe Differenzierung von fehlendem Sox9 begünstigt wird (Abb. 4.35).

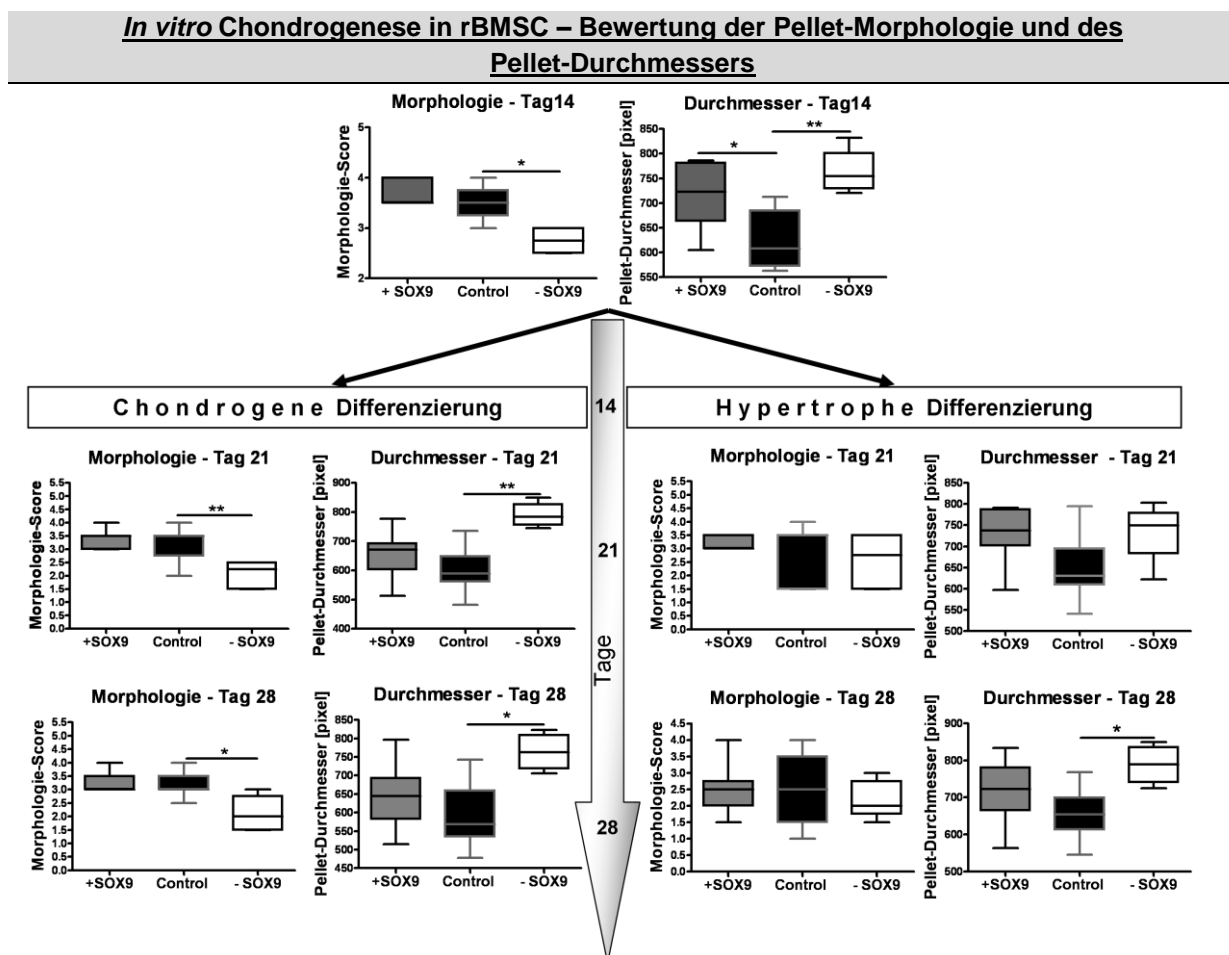


Abbildung 4.35 Die Ergebnisse der morphologischen Bewertung sowie der Messung der Aggregatdurchmesser zeigen nach zwei Wochen eine deutlich schlechtere Morphologie und einen größeren Durchmesser für –SOX9-Aggregate. Für +SOX9-Aggregate war ein vergrößerter Durchmesser bei unveränderter Morphologie zu sehen (obere Diagramme). Für –SOX9-Aggregate bleibt dieses Ergebnis an Tag 21 und Tag 28 unter chondrogenen Bedingungen erhalten (links). An Tag 28 zeigen die -SOX9-Aggregate unter hypertrophen Bedingungen allerdings einen erhöhten Durchmesser bei unveränderter Morphologie, also eine tatsächliche Größenzunahme (rechts).

Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * p<0,05; ** p<0,01; n=6;

4.12.2.3 Histologische Auswertung der rBMSC-Aggregate mittels Alcianblau Färbung

Um die ECM-Struktur der einzelnen Aggregate zu untersuchen, wurden nach 28 Tagen Differenzierung histologische Schnitte hergestellt, mit Alcianblau die Proteoglykane angefärbt und diese Färbung anhand eines modifizierten *Bern Scores* (Grogan, Barbero et al. 2006) bewertet. Dieser bezieht die Einheitlichkeit und Intensität der Färbung, den Abstand der Zellkerne zueinander, also die Menge der gebildeten Matrix und die Einzelzellmorphologie mit in die Bewertung ein. Für jede Kategorie können maximal drei Punkte vergeben werden, die für die Gesamtwertung aufsummiert werden. Die maximale Punktzahl ist demnach neun. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung einer verbesserten ECM-Struktur von +SOX9-Aggregaten unter chondrogenem Stimulus, verglichen mit hypertrophen Bedingungen. Auch innerhalb der chondrogenen Gruppe zeigte die Proteoglykananalyse eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle, wohingegen in der Hypertrophiegruppe die +SOX9-Aggregate eine stark verschlechterte Struktur der ECM aufweisen, bei der kaum noch Einzelzellen zu erkennen waren und die Matrixintegrität als sehr schlecht bewertet werden muss (Abb. 4.36 A). Die Bilder in Abbildung 4.36 B zeigen charakteristische Beispielfärbungen.

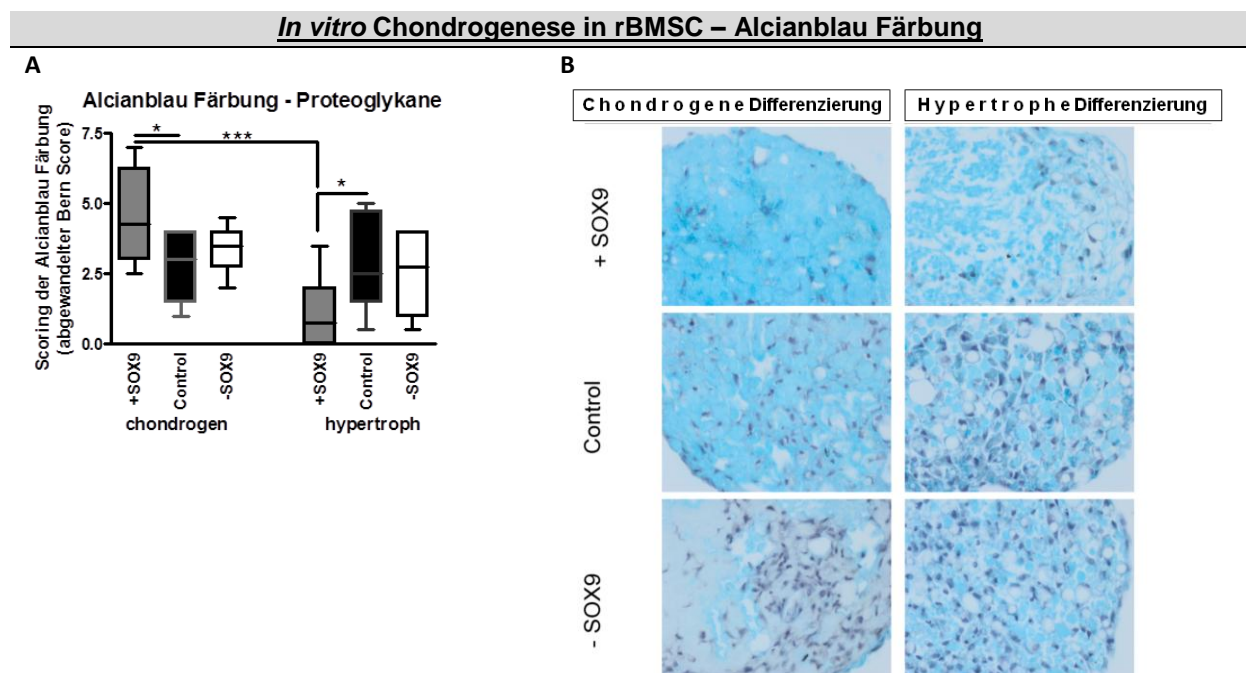


Abbildung 4.36 Auswertung und repräsentative Beispielbilder der Alcianblau gefärbten Aggregate. A) +SOX9-Aggregate weisen eine deutlich bessere Alcianblau Färbung (bewertet nach modifizierten Bern Score) unter chondrogenen Bedingungen im Vergleich zu hypertrophen Bedingungen auf, wie auch innerhalb der chondrogenen Gruppe im Vergleich zu Kontrollaggregaten. Innerhalb der hypertrophen Gruppe ist bei +SOX9-Aggregaten eine Verschlechterung der Alcianblau Färbung, verglichen zur Kontrolle, zu erkennen. B) Repräsentative Fotos der gefärbten Aggregate in 400-facher Vergrößerung. Die Proteoglykane der ECM von –SOX9, +SOX9 und Kontrollaggregate, unter hypertrophen und chondrogenen Bedingungen, sind mittels Alcianblau in hellblau gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin (nach Weigert) (dunkelblau). Ergebnisse zeigen den Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$; $n = 3-6$;**

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen, dass die Dosis des Transkriptionsfaktors Sox9 die Apoptose, die Proliferation sowie das Differenzierungspotential von adulten mesenchymalen Stammzellen maßgeblich beeinflusst. Im Speziellen wurde dabei die Expression und intrazelluläre Lokalisation des Zellzyklusinhibitors p21 sowie die Expression und Stabilität des pro-proliferativen Proteins Cyclin D1 als reguliert gezeigt. Letzteres passiert in einem p38-abhängigen Mechanismus. Die Änderung der Cyclin D1 Expression hatte eine Regulierung von Osteocalcin und p21 zur Folge und lässt somit schlussfolgern, dass Sox9 über verschiedene indirekte Mechanismen verfügt, um gleichzeitig die Differenzierung, als auch die Zellvitalität in adulten MSC beeinflussen zu können. Sox9 spielt demnach möglicherweise eine ausschlaggebende, noch kaum untersuchte Rolle als Mediator, der die Balance zwischen Differenzierung und Wachstum/Apoptose entscheidend beeinflussen kann.

5.1 BMSC versus ASC

Wir haben den Einfluss einer veränderten Sox9 Dosis in rASC und rBMSC bezüglich Apoptose, Proliferation und osteogener Differenzierungsfähigkeit untersucht und verglichen, um die allgemeine Gültigkeit beziehungsweise die Stammzelltyp-Spezifität unserer Ergebnisse überprüfen zu können.

Beide MSC-Typen zeigen eine verlangsamte Proliferation nach Sox9 Inhibition sowie eine Induktion von p21 und Cyclin D1. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der unabhängig vom MSC-Ursprung, die Expression dieser Proteine als Antwort auf eine Sox9 Inhibition reguliert. In rBMSC wird die verlangsamte Proliferation noch zusätzlich von einer verstärkten Apoptose begleitet, was auf eine im Allgemeinen schlechtere Vitalität der Zellen durch fehlendes Sox9 hindeutet. In rASC hingegen wurde die Apoptose nicht induziert nach Sox9 *Knockdown*. Dies liegt möglicherweise am höheren Ausgangslevel von Sox9 in rASC verglichen mit rBMSC. Nach Sox9 Inhibition waren im Schnitt in rASC in 100ng RNA noch 5000 Kopien der Sox9 cDNA nachzuweisen, wohingegen in rBMSC durchschnittlich lediglich noch um die 1000 Sox9 cDNA Kopien nach der Inhibition gemessen wurden. Denkbar wäre demnach ein Schwellenwert von Sox9, unterhalb dem MSC Apoptose einleiten, und der von rASC durch ein Sox9 *Silencing* nicht erreicht wird. Die Proliferation, sowie die p21 und Cyclin D1 Expression, scheinen unabhängig von der absoluten Sox9 Menge beeinflusst zu werden. Dazu reichte die relative Verringerung um mindestens 50% im Vergleich zu den Kontroll-Zellen.

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung von rASC und rBMSC zeigen zum einen, dass es in beiden Zelltypen zu einem pro-osteogenen Effekt durch die Inhibierung von Sox9, vor allem während der mittleren Phase der Differenzierung, kommt. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass es vermutlich eine Art „Vordeterminierung“ der Zellen in ihrem Ursprungsgewebe geben könnte, da rBMSC im Vergleich zu rASC eine deutlich stärkere Kalzifizierung der gebildeten Matrix im Verlauf der Osteogenese nach Virustransduktion zeigen. Dieser Unterschied zeigte sich deutlich geringer wenn rASC und rBMSC in Passage 2, ohne vorherige Virustransduktion und Selektion, osteogen

differenziert wurden, wie in Abbildung 4.1 A gezeigt wurde. Daraus kann man schließen, dass die Gewebe-Determinierung der MSC nach mehreren Passagen möglicherweise verstärkt zum Tragen kommt. Jansen et al. zeigten, dass die Genexpressionsprofile von MSC auf Grund ihres Ursprungs vordeterminiert und somit unterschiedlich sind (Jansen, Gilissen et al. 2010), was unsere Beobachtungen unterstützt. Ein Unterschied in der Genexpression verschiedener Marker zwischen rASC und rBMSC konnte in dieser Arbeit ebenso gezeigt werden (Abb. 4.2). Überraschend dabei war die deutlich stärkere Sox9 Expression in rASC im Vergleich zu rBMSC. Da wir zeigen konnten, dass Sox9 einen pro-proliferativen Effekt in rBMSC, wie auch in rASC hat, ist es denkbar, dass das schnellere Wachstum von rASC verglichen mit rBMSC, das wir und auch andere Gruppen (Zhu, Du et al. 2012) (Reich, Raabe et al. 2012) beobachten konnten, unter anderem durch die erhöhte Sox9 Expression in rASC verursacht ist.

Darüber hinaus kam es zu einer erhöhten Osteocalcin Expression in undifferenzierten rASC der zweiten Passage im Vergleich zu rBMSC. Dies steht im Konflikt mit den Ergebnissen von Ducy et al., die Osteocalcin als spezifischen Osteoblastenmarker postulieren (Ducy, Desbois et al. 1996). Wir vermuten vielmehr, dass Osteocalcin, in kleinen Mengen, bereits in MSC, unabhängig vom Ursprung, exprimiert und synthetisiert wird. Genau wie in undifferenzierten MSC, zeigten rASC wie auch rBMSC eine Induktion der *Osteocalcin* Genexpression an Tag 14 während der *in vitro* Osteogenese wenn Sox9 inhibiert ist. Unsere Resultate deuten auf eine allgemein gültige Regulierung, genauer eine Inhibierung, der Osteocalcin Expression durch Sox9 hin.

Die Expression von Osteocalcin in undifferenzierten MSC lässt eine zusätzliche Funktion dieses Proteins, neben der Ca^{2+} -bindenden Eigenschaft, die es während der Knochenmineralisierung aufweist, vermuten. *Ex vivo* sind Osteocalcinmengen im Picomol-Bereich in der Lage die *Cyclin D1* und *Insulin* Genexpression, sowie Proliferationsmarker in Beta-Zellen zu stimulieren. Nanomolare Mengen von Osteocalcin hingegen aktivieren die Adiponektin Expression, ein Insulin-sensitives Adipokin in Adipozyten (Ferron, Hinoi et al. 2008) (Lee, Sowa et al. 2007). Osteocalcin könnte also demnach einen möglichen neuen Regulator zwischen Glucose-Metabolismus und Proliferation darstellen. Diese Rolle in der Insulin Regulation könnte auch eine Erklärung für die erhöhte Osteocalcinmenge in rASC im Vergleich zu rBMSC in Passage zwei sein.

Anders als für Beta-Zellen berichtet, konnten wir für rBMSC eine Cyclin D1-abhängige Regulierung der Osteocalcinmenge zeigen, was in Abschnitt 5.4.1 genauer diskutiert wird, und auf einen Feedback Mechanismus zwischen diesen beiden Proteinen deuten könnte. Es ist außerdem denkbar, dass auch in rASC die Osteocalcin Expression Cyclin D1-vermittelt ist, da es in diesen Zellen, genau wie auch in rBMSC, zu einer Induktion von Cyclin D1 nach Sox9 Inhibition kommt. Wir konnten feststellen, dass mit Ausnahme der Induktion der Apoptose nach Sox9 *Knockdown*, die in rASC und rBMSC durchgeführten Versuche vergleichbare Ergebnisse lieferten, so dass gezogene Schlussfolgerungen im Folgenden möglicherweise für MSC unabhängig des Ursprungs gültig sind.

In den nächsten Abschnitten werden hauptsächlich die Ergebnisse der rBMSC im Detail diskutiert, da auf der Untersuchung dieses Stammzelltyps, im Zusammenhang mit Sox9, der Fokus dieser Arbeit liegt.

5.2 Sox9 reduziert die Apoptose in MSC via Caspase- und Bcl-2

Unsere Daten demonstrieren, dass eine reduzierte Sox9 Aktivität Apoptose in undifferenzierten adulten rBMSC induziert und dass dieser Effekt nach Sox9 Überexpression reversibel ist. In Sox9 *Knockdown* Zellen wird das anti-apoptotische Protein Bcl-2 vermindert exprimiert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gleichzeitig verstärkt. Man weiß, dass Bcl-2 durch Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials der Apoptose entgegenwirken kann (Kowaltowski, Cosso et al. 2002). Caspasen dagegen sind spezifische Proteasen die, zum Beispiel durch einen Stressstimulus wie UV-Strahlung, aktiviert werden und in Vorbereitung des programmierten Zelltods, Proteine spalten können. Caspase 3 und 7 gehören zu den Effektor-Caspasen, also den späten Caspasen, die auf zelleigene Strukturproteine wie Aktin (Kayalar, Ord et al. 1996) und Lamin (Takahashi, Alnemri et al. 1996) wirken können. Yagi et al. konnten 2005 zeigen, dass die Inhibition von Bcl-2 eine Reduktion der Sox9 Genexpression zur Folge hat (Yagi, McBurney et al. 2005). Zusammen mit unseren Ergebnissen ist ein indirekter Feedbackmechanismus zwischen Sox9 und Bcl-2 denkbar, was vermutlich aber noch andere Effektorproteine involviert. Eine andere Möglichkeit der Regulation ist daneben die Caspase-abhängige Spaltung von Bcl-2. Bcl-2 ist als physiologisches Substrat von Caspase 3 bekannt. Das pro-apoptotische Protein Bax wird dagegen nicht von Caspase 3 oder 7 degradiert (Kirsch, Doseff et al. 1999). In unseren Zellen konnten wir eine starke Reduktion des Bcl-2 Proteins nach Sox9 *Knockdown* messen, und eine geringe Änderung der Bax Expression. Daher schlagen wir ein Model vor, nach dem eine Inhibition von Sox9 eine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 zur Folge hat, die wiederum spezifisch Bcl-2 spalten und abbauen können. Die Veränderung im Bax/Bcl-2 Verhältnis nach Sox9 *Knockdown*, beziehungsweise Überexpression, sind demnach vor allem durch eine veränderte Bcl-2 Menge verursacht. Das Bax/Bcl-2 Verhältnis ist ein typischer Indikator der Apoptoserate (Perlman, Zhang et al. 1999) und zeigt hier die anti-apoptotische Funktion von Sox9 in rBMSC.

Auch die Induktion von p21 nach Sox9 *Knockdown* trägt wahrscheinlich zu der verstärkt induzierten Apoptose in unserem System bei. Es wurde bereits gezeigt, dass p21 nicht nur die Proliferation von Zellen stoppt (Dulic, Stein et al. 1998), sondern auch, dass eine Überexpression von p21, wie wir sie in -SOX9 Zellen beobachten konnten, Apoptose mit sich bringen kann (Boudreau, Werb et al. 1996). Es ist anzunehmen, dass durch die fortwährende Expression von p21 eine permanente Blockade der DNA Reperatur verursacht wird, was letztendlich zum Tod der Zelle führt (Duttaroy, Qian et al. 1997). Zusammenfassend schlagen wir also ein Model vor, bei dem die Inhibition des Transkriptionsfaktors Sox9 zum einen die Caspase3/7-Kaskade aktiviert, wodurch Bcl-2 abgebaut wird und gleichzeitig, durch einen noch unbekannten Mechanismus, Bax schwach induziert wird. Zum anderen wird p21 vermehrt exprimiert und in den Zellkern transportiert. Beides trägt dazu bei, dass die Apoptose durch das Inhibieren von Sox9 verstärkt wird (Abbildung 5.1). Im Umkehrschluss schützt eine Überexpression von Sox9 rBMSC vor Apoptose. Dabei sollte allerdings auch erwähnt werden, dass eine Unterdrückung der Apoptose, wie in unserem Fall durch erhöhte Bcl-2 Expression in +SOX9 Zellen, nicht nur als positiv bewertet werden kann, sondern potentiell onkogenes Potential besitzt.

In Abbildung 5.1 wird die Sox9-abhängige Induktion der Apoptose in mesenchymalen Stammzellen durch Regulierung der Caspase Aktivität, der Bax und Bcl-2 Expression sowie der p21 Lokalisation zusammengefasst und schematisch dargestellt.

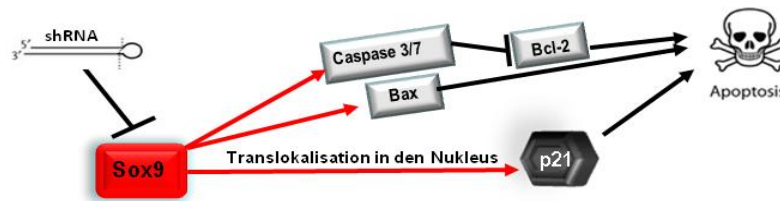


Abbildung 5.1 Schema der Sox9-abhängigen Apoptoseinduktion in rBMSC. Eine Inhibition von Sox9 führt zu verstärkt aktiven Caspasen 3 und 7 sowie zu einer schwachen Induktion des pro-apoptotischen Proteins Bax. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird gleichzeitig, vermutlich durch die verstärkte Caspaseaktivität, stark inhibiert. Vermehrte Akkumulation von p21 im Zellkern trägt zusätzlich zu einer erhöhten Apoptoserate in Sox9 *Knockdown* Zellen bei.

5.3 Sox9 beeinflusst Cyclin D1-abhängig die Proliferation via p21

Neben einer reduzierten apoptotischen Aktivität konnten wir, als weitere Auswirkung der Sox9 Dosis, eine veränderte Proliferation mithilfe eines BrdU-Assays, Durchflusszytometrie und Wachstumskinetik in MSC feststellen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass eine verstärkte apoptotische Aktivität und eine verlangsamte Proliferation vermutlich nicht unabhängige Ereignisse sind und die gemessenen Ergebnisse einander beeinflussen. Zutreffender wäre es wohl, ganz allgemein von einer Änderung der Zellvitalität zu sprechen.

Unsere Ergebnisse, die zeigen, dass die Inhibition von Sox9 in rBMSC das Zellwachstum verlangsamt und gleichzeitig die Apoptose induziert, werden von den Daten von Shi und Kollegen unterstützt. Sie konnten nachweisen, dass Sox9 die Proliferation in epidermalen Keratinozyten beschleunigen kann und die Zellen vor UVB-induzierter Apoptose schützt (Shi, Sohn et al. 2013). Diese Eigenschaften erklären möglicherweise die oft beschriebene pro-onkogene Funktion von Sox9 (siehe Tabelle 2).

Darüber hinaus zeigt die aktuelle Literatur, dass die Expression von Sox9 oft mit der von p21 (Jiang, Fang et al. 2010; Saegusa, Hashimura et al. 2012) oder auch mit Cyclin D1 assoziiert ist (Akiyama, Lyons et al. 2004). p21 wird klassischerweise als Zellzyklusinhibitor bezeichnet. Cyclin D1 fungiert dagegen eher pro-proliferativ. Die Expression der beiden Zellzyklusregulatoren, und deren vermeintlich antagonistische Funktion, müssen allerdings immer im Kontext betrachtet werden. Cyclin D1 kann p21 zum Beispiel auch vor Degradation bewahren und stabilisieren, wie es für Mausfibroblasten berichtet wurde (Coleman, Marshall et al. 2003).

Da wir eine Überexpression von p21 nach Sox9 *Knockdown* beobachten konnten, sowie eine Akkumulation im Zellkern, vermuten wir neben der Apoptose-assoziierten Funktion auch eine zentrale Rolle für p21 in der Proliferationshemmung. In Lungenadenokarzinomen konnte dieser Zusammenhang zwischen Sox9 und p21 bereits gezeigt werden (Jiang, Fang et al. 2010). Die Lokalisation von p21 spielt sowohl für die Inhibierung der Proliferation, wie auch für die Induktion der

Apoptose eine entscheidende Rolle. Für nukleäres p21 ist bekannt, dass es zu einem Zellzyklusarrest führt, wohingegen zytoplasmatisches p21 die Apoptose inhibiert und pro-proliferativ wirken kann (Asada, Yamada et al. 1999). Diese unterschiedlichen Funktionen von p21 wurden von Ranta et al. sowie von Vincent et al. kürzlich bestätigt (Ranta, Leveringhaus et al. 2011; Vincent, Ren et al. 2012). In –SOX9 Zellen gibt es eine deutliche Akkumulation von p21 im Kern, was wir als Ursache für das verlangsamte Zellwachstum postulieren.

Man weiß, dass vor allem der Übertritt von G1 zur S-Phase durch den Zellzyklusinhibitor p21 kontrolliert wird (Reed, Bailly et al. 1994). Dies unterstützt unsere Ergebnisse einer reduzierten S-Phase-Population bei verstärkter p21 Expression in –SOX9 Zellen. Zwar konnten wir auch eine verstärkte Expression des pro-proliferativen Proteins Cyclin D1 nach Sox9 Inhibition beobachten, allerdings keine Änderung der zellulären Lokalisation. Cyclin D1 war vielmehr in –SOX9 rBMSC stabilisiert und zeigte eine verlängerte Halbwertszeit, jedoch keine Akkumulation im Kern (Abb. 4.19, 4.12).

Ein potentieller Mechanismus, durch den p21 in den Kern importiert wird, ist durch die Bindung an Cyclin D1 und CDK4 (Cheng, Olivier et al. 1999). Zwar konnten wir keine Regulierung von CDK4 in –SOX9 rBMSC feststellen, jedoch eine deutlich erhöhte Stabilität von Cyclin D1, was wahrscheinlich entscheidend zur Translokation von p21 beiträgt. Das könnte die Frage beantworten, wie ein klassischer Zellzyklusinhibitor wie p21 und ein pro-proliferatives Protein wie Cyclin D1 gleichzeitig hochreguliert werden können und es trotzdem zu einer Hemmung des Wachstums kommt. Lokalisation und Stabilität, sowie die Wechselwirkung der beiden Proteine in hohen Konzentrationen könnte die Antwort darauf sein. Coleman und seine Mitarbeiter vermuten, dass ein hoher Cyclin D1 Level ausreicht, um die Proteasom-vermittelte Degradierung von p21 zu inhibieren (Coleman, Marshall et al. 2003). Auf diese Weise könnte also die erhöhte Menge an Cyclin D1 dazu beitragen, nicht nur p21 in den Kern zu importieren, sondern das Protein darüberhinaus vor dem Abbau zu schützen. Diese Hypothese stützen wir durch Experimente, die zeigen, dass die p21 Expression in –SOX9 rBMSC Cyclin D1-abhängig reguliert wird.

Der von uns vermutete Grund für die hohe Cyclin D1 Menge ist eine Stabilisierung des Proteins aufgrund fehlerhafter p38-Aktivierung, was in Abschnitt 5.4 ausführlich diskutiert wird.

Eine duale Rolle für p21 wurde im Bereich der Karzinogenese gezeigt. Zum einen kann p21 als Tumorsuppressor wirken, auf der anderen Seite inhibiert p21 die Apoptose und agiert somit onkogen (Cmielova and Rezacova 2011). Sox9 könnte also sein onkogenes Potential, wie bereits in 1.1.3 beschrieben, durch die Regulierung von p21 ausüben, wie von Jiang et al. für Lungenadenocarcinoma vorgeschlagen (Jiang, Fang et al. 2010).

Abbildung 5.2 zeigt zusammenfassend den von uns vorgeschlagenen Mechanismus der Sox9-abhängigen Regulation des Zellwachstums in rBMSC. Über eine fehlende Aktivierung von p38 (siehe 5.5) kommt es zu verzögertem Abbau von Cyclin D1, was eine verstärkte Expression und nukleare Lokalisation von p21 zu Folge hat und letztendlich inhibierend auf den Zellzyklus wirkt. Eine mögliche, direkte Bindung zwischen Cyclin D1 und p21 ist denkbar, müsste allerdings mittels zukünftiger Experimenten wie Immunopräzipitation oder einem *Proximity Ligation Assay*, letztlich noch bestätigt werden.

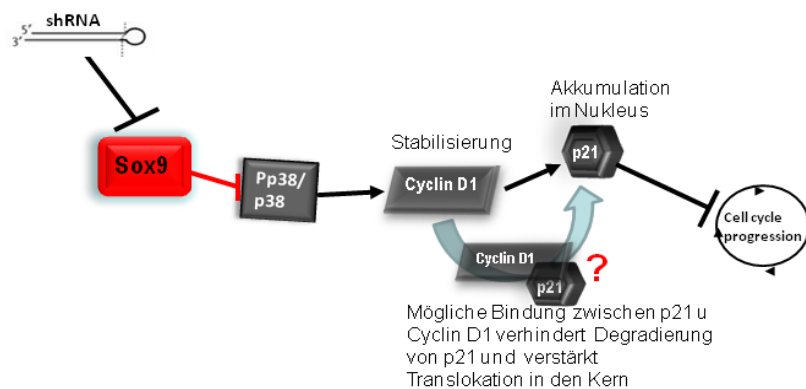


Abbildung 5.2 Schema der Sox9-abhängigen Proliferationshemmung in rBMSC.
 Eine Inhibition von Sox9 führt zu einer reduzierten Aktivierung von p38, zu stabilisiertem Cyclin D1 Protein und verstärkter Expression von p21, was vermehrt im Kern lokalisiert ist und somit den Zellzyklus inhibiert.

5.4 Sox9 beeinflusst das Differenzierungspotential von MSC

5.4.1 Der Einfluss von Sox9 auf die osteogene Differenzierung

Neben der bekannten Funktion von Cyclin D1 im Zellzyklus weiß man auch, dass Cyclin D1 unter anderem von β -Catenin reguliert wird und notwendig ist für die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen.

Allerdings konnten wir für β -catenin weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene eine Änderung der Expression in –SOX9 rBMSC messen und nehmen deshalb eine β -catenin unabhängige Regulierung von Cyclin D1 im Anschluss an einen Sox9 *Knockdown* an.

Mirando et al. berichteten von diversen knöchernen Anomalitäten in Cyclin D1 $-/-$ Mäusen (Mirando, Maruyama et al. 2010). Darunter waren eine verzögerte Ossifikation der Neugeborenen sowie eine verminderte Mineralisierung. Er vermutete eine Behinderung der Osteoblastenentwicklung durch das Fehlen von Cyclin D1. Da wir zum einen eine verstärkte Cyclin D1 Expression und Stabilisierung in Sox9 *Knockdown* rBMSC zeigen, und gleichzeitig eine verstärkte, für Osteoblasten charakteristische, Osteocalcine Sekretion, kann vermutet werden, dass auch in unserem Kontext Cyclin D1 einen Einfluss auf die Osteogenese nimmt. Diese Annahme konnten wir durch die transiente Inhibition der Cyclin D1 Expression mittels siRNA in –SOX9 Zellen bestätigen, da diese eine Reduktion von Osteocalcin zur Folge hatte.

Nachdem wir Sox9 *Knockdown* Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen osteogen differenziert hatten, war bereits nach zwei Wochen eine erhöhte Expression von typischen, osteoblastären Markergenen (*Osteocalcin*, *Runx2*, *Vegfa*, *Mmp13*) in rBMSC nachweisbar, was ebenfalls für ein verstärktes Differenzierungspotential und einen pro-osteogenen Effekt einer Sox9 Inhibition spricht. rASC mit inhibiertem Sox9 zeigten ähnliche Ergebnisse, jedoch nur für *Osteocalcin* (Tag 14), *Vegfa* und *Mmp13* (Tag21) und bestätigten den positiven Effekt eines Sox9 *Knockdowns* Stammzelltyp-unabhängig auf die *in vitro* Osteogenese. Auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie die

Mineralisierung nach drei Wochen waren tendenziell verstärkt, aufgrund der hohen interexperimentellen Variabilität nicht signifikant in rBMSC, jedoch für rASC bezüglich der Kalzifizierung.

Wir vermuten außerdem keine direkte, sondern eine indirekte Regulierung der Osteocalcin Expression durch Sox9, da sich keine Sox9-Bindesequenz im Promotorbereich von *Osteocalcin* finden lässt. Zwar konnten wir zweifelsfrei die p38-abhängige Beteiligung von Cyclin D1 an der Osteocalcin Regulierung zeigen, ob und welche anderen Proteine aber darin noch involviert sind bleibt ungeklärt. Die direkte Aktivierung durch Dlx5, einem Regulator der *Osteocalcin* Genexpression, konnten wir bereits mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays ausschließen (Abb. 4.6). Es ist allerdings bekannt, dass sich im Promotorbereich von *Osteocalcin* unter anderem drei Bindemotive für Runx2 befinden (Lian, Stein et al. 2001). Da zwar die *Runx2* Expression in –SOX9 rBMSC reduziert ist, die *Osteocalcin* Expression im Gegensatz dazu jedoch induziert ist, handelt es sich vermutlich um eine andere Art von Regulierung. Für *Msx2* wurde berichtet, dass es in frühen Osteoblasten inhibierend auf den Osteocalcin-Promotor wirkt (Lian, Stein et al. 2001). In –SOX9 rBMSC wurde jedoch eine erhöhte *Msx2* Expression gefunden, was diesen Mechanismus eher unwahrscheinlich macht. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Osteocalcin-Regulierung bedarf noch weiterer zukünftiger Untersuchungen.

Auch zu erwähnen ist, dass in undifferenzierten –SOX9 rBMSC osteogene Markergene wie *Col1a1*, *Mmp13*, *Alp*, *Runx2* und *Vegfa* schwächer exprimiert werden, als in den jeweiligen Kontrollen oder Sox9 Überexpressionszellen, was auf eine Entwicklungsstadien-spezifische, wie auch dosisabhängige Wirkung von Sox9 während der Osteogenese schließen lässt.

Werden Sox9 Überexpressionszellen osteogen differenziert, zeigen die untersuchten Marker ebenfalls eine Entwicklungsstadien-spezifische Regulierung. *Runx2*, *Alp* und *Msx2* werden zu Beginn der Differenzierung durch eine erhöhte Sox9-Dosis in rBMSC unterdrückt, wohingegen *Osteocalcin* induziert wird. Nach zwei und drei Wochen Differenzierung wird *Osteocalcin* allerdings wieder vermindert exprimiert im Vergleich zu Kontrollzellen. *Col1a1* wird vor allem zum Ende der Differenzierung unterdrückt. Venkatesan et al. zeigten, dass humane MSC, die mit einer kodierenden Sequenz von Sox9 transduziert und anschließend osteogen differenziert wurden, eine starke Reduktion der *Alp*, *Col1a1*, *Osteopontin* und *Runx2* Expression nach 21 Tagen Kulturzeit aufwiesen (Venkatesan, Ekici et al. 2012). Allerdings waren alle von ihnen benutzten humanen Stammzellen höchstens in Passage zwei, also noch in einer niedrigeren Passage als die in unserer Studie eingesetzten Ratten MSC. Dies deutet auf eine speziesspezifische Sensibilität, aber auch auf einen von der Passagenanzahl abhängigen Einfluss einer veränderten Sox9 Menge auf das osteogene Potenzial hin. Ratten MSC in Passage drei oder vier scheinen ihre Genexpression dabei weniger stark zu regulieren im Vergleich zu humanen MSC der Passage zwei.

Zusammenfassend begünstigt die Inhibition von Sox9 in rBMSC wie auch in rASC die osteogene Differenzierung und verleiht den Zellen eine Art „Differenzierungsvorsprung“ vor den Kontrollzellen. Eine Überexpression von Sox9 in rBMSC wirkt hingegen anti-osteogen, reicht alleine allerdings nicht aus um die Osteogenese zu unterbinden, sondern vermag sie lediglich abzuschwächen oder zu verzögern.

5.4.2 Der Einfluss von Sox9 auf die adipogene Differenzierung

Die unter Abschnitt 4.10 präsentierten Ergebnisse zeigen einen inhibierenden Einfluss einer Sox9 Reduktion auf die mRNA Expression verschiedener adipogener Marker während der *in vitro* Adipogenese sowie auf die Proteinexpression des Adipozyten-spezifischen Transkriptionsfaktors C/EBP β in undifferenzierten rBMSC.

Die Funktion von Cyclin D1 wurde auch bereits während der Adipogenese untersucht. In einer *Microarray*-Studie mit Cyclin D1-überexprimierenden Tumoren, konnte C/EBP β als Ziel von Cyclin D1 identifiziert werden (Lamb and Ewen 2003; Lamb, Ramaswamy et al. 2003). Lamb und Kollegen vermuten, dass der Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Adipozytenentwicklung, C/EBP β , ein konstitutiver Repressor von Cyclin D1 Zielgenen ist und dass Cyclin D1 dieser Repressorfunktion entgegenwirkt. Wir unterstützen diese Hypothese von Cyclin D1 und C/EBP β als potentielle Antagonisten, da wir in Sox9 *Knockdown* Zellen zum einen eine deutlich erhöhte Cyclin D1 Expression fest stellten und zum anderen gleichzeitig eine starke Reduktion der C/EBP β Protein Menge. Es handelt sich in unserem Kontext allerdings nicht um einen direkten Mechanismus, da ein *Knockdown* von Cyclin D1 in –SOX9 rBMSC den verminderten C/EBP β Proteinspiegel nicht wieder erhöhen konnte (Abbildung 4.15). Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass eine Suppression der C/EBP β / δ Promotoraktivität durch direkte Sox9 Bindung vermittelt wird und somit die adipogene Differenzierung von 3T3-L1 (Prä-Adipozyten-Zelllinie) verhindert werden kann (Wang and Sul 2009). In primären adulten rBMSC scheint dieser Mechanismus jedoch anders zu funktionieren, da ein Fehlen von Sox9 keine Induktion von C/EBP β zur Folge hat, sondern vielmehr eine Reduktion. Wir vermuten demnach einen indirekten Effekt von Sox9 auf C/EBP β , durch Stabilisierung der C/EBP β mRNA. Die Destabilisierung, die wir in –SOX9 rBMSC zeigen konnten und die in reduzierter Proteinmenge resultiert, trägt vermutlich zu dem verminderten adipogenen Differenzierungspotential in –SOX9 rBMSC bei, welches wir durch die Regulierung verschiedener adipogener Markergene zeigen konnten (Abb 4.14). Die zeitliche Relevanz der Sox9 Expression scheint hierbei, wie auch schon bei der osteogenen Differenzierung, von großer Bedeutung, da die verschiedenen Adipogenesemarkergene vor allem zu Beginn der Differenzierung reguliert werden. Die Entstehung von Lipidtropfen im Laufe der Differenzierung konnte allerdings nur wenig beeinflusst werden, so dass, auch im Zuge der Adipogenese, die Sox9 Dosis stärker reduziert oder induziert werden müsste, um die Differenzierung letztendlich zu verhindern oder stark zu beschleunigen.

C/EBP β wurde außerdem als potentieller Mediator der Proliferation beschrieben. Eine Inhibition von C/EBP β führte dabei zur Inhibition anderer Transkriptionsfaktoren, wie IRF $_4$, XBP1 und BLIMP1, und einer starken Reduktion der Proliferation (Pal, Janz et al. 2009). Die Reprimierung von C/EBP β trägt somit möglicherweise auch, indirekt über andere (Transkriptions-)Faktoren, zur Verlangsamung der Proliferation nach Sox9 *Knockdown* bei.

Daneben wurde auch die direkte Bindung von C/EBP β an den Promotor von Bcl-2, sowie die Tatsache, dass eine Inhibition von C/EBP β eine Inhibition von Bcl-2 zur Folge hat, bereits beschrieben (Pal, Janz et al. 2009). Wir vermuten daher für Sox9 *Knockdown* Zellen auch einen negativen Einfluss der reduzierten C/EBP β Menge auf die Bcl-2 Expression, was in der Folge zu der erhöhten Apoptoserate beiträgt, die in –SOX9 rBMSC gemessen werden konnte.

Zusammenfassend konnten wir also eine starke Reduktion des adipogenen Mastertranskriptionsfaktors C/EBP β , aufgrund destabilisierter mRNA, in –SOX9 rBMS nachweisen und eine verminderte Expression einzelner, spezifischer Markergene während der *in vitro* Adipogenese. Wir postulieren demnach eine verminderte adipogene Differenzierungsfähigkeit für Sox9 *Knockdown* Zellen. Unsere Ergebnisse stehen mit denen von Wang et al. im Konflikt, die zeigten, dass eine Inhibition von Sox9 eine Voraussetzung für die Adipogenese in humanen MSC ist (Wang and Sul 2009). Es scheint auch hier wieder spezies-, stadien-, und passagespezifische Unterschiede zu geben. Vor allem zu Beginn und in der mittleren Phase der Differenzierung finden wir eine Inhibition der Expression von Markergenen. Am Ende konnte allerdings zwischen –SOX9 und Kontrollzellen kein Unterschied in der Ölrot O Färbung, wie auch in der gemessenen Genexpression gefunden werden. Die anti-adipogene Wirkung einer Sox9 Inhibition, vorallem an Tag 14, hat sich nach drei Wochen Differenzierung wieder relativiert und ist nicht mehr nachweisbar.

5.4.3 Der Einfluss von Sox9 auf die chondrogene Differenzierung

Die Applikation von autologen MSC in das Kniegelenk von OA Patienten nach einer *in vitro* Passage wurde unter anderem von Davatchi und Kollegen in Teheran, Iran, mit mäßigem Erfolg durchgeführt (Davatchi, Abdollahi et al. 2011). Eine andere aktuelle Veröffentlichung aus Spanien berichtet jedoch von positiven Ergebnissen einer ähnlichen Studie, bei der autologe MSC expandiert und anschließend intra-artikulär in das Kniegelenk von Patienten injiziert wurden. Es kam zu einer deutlichen Abnahme des Schmerzempfindens sowie zu verbesserter Knorpelqualität in dem betroffenen Gelenk bei 11 von 12 Probanden (Orozco, Munar et al. 2013). Dennoch ist ein Manko dieser Methode der geringe Prozentsatz an Zellen, der eine funktionelle chondrogene Differenzierung durchläuft, um adäquaten Ersatzknorpel zu produzieren. Entscheidend bei der Anwendung von MSC zum Zwecke der Knorpelregeneration ist außerdem, die Zellen nach der Differenzierung in einem nicht-hypertrophen Zustand zu halten, um eine mögliche Ossifikation zu verhindern (Prockop 2009; Hollander, Dickinson et al. 2010). Da Sox9 die Chondrogenese stimuliert (Bi, Deng et al. 1999), und gleichzeitig während der Hypertrophie nicht mehr exprimiert wird (Magne, Vinatier et al. 2005), scheint die Überexpression von Sox9 als Transgen eine theoretische Möglichkeit für den Erhalt eines chondrogenen, nicht-hypertrophen Phänotyps, zu sein.

Unsere Daten zeigen jedoch, dass nach retroviraler Transduktion von rBMS mit einem Sox9 Überexpressionsvektor nur zu Beginn der Chondrogenese eine Verbesserung durch zusätzliches Sox9, aber keine klare Hemmung der Hypertrophie gefunden werden konnte.

Der Ursprung, der Zustand und das Alter (Anzahl der Passagen) der adulten Stammzellen, sowie die Transfektions- oder Transduktionsmethode, sind vermutlich von zentraler Bedeutung für die Ergebnisse derartiger Versuche. So konnten Venkatesan et al. für humane MSC, transduziert mit einem Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektorsystem in Passage zwei, zeigen, dass Sox9 das chondrogene Potential der Zellen verstärkt (Venkatesan, Ekici et al. 2012). Kupcsik et al. benutzten humane MSC zusammen mit adenoviralen Vektoren und fanden, dass Sox9 zwar die Expression

seiner Zielgene induzieren kann, jedoch nicht die Synthese von Glykosaminoglykanen (Kupcsik, Stoddart et al. 2010).

Der wohl entscheidende Unterschied unserer Studie zu den meisten anderen ist die Antibiotikaselektion, die wir an die virale Transduktion anschlossen, um in ausnahmslos allen rBMSC die Sox9-Dosis gezielt manipulieren zu können. Der Preis dafür war allerdings eine Verlängerung der Kulturzeit um zwei bis drei Wochen (Passage drei bis vier). Für murine MSC wurde bereits gezeigt, dass die chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit mit der Anzahl der Passagen abnimmt (Kretlow, Jin et al. 2008). Ähnliches vermuten wir auch für Ratten-MSC, vor allem im Zusammenhang mit der chondrogenen Differenzierung. Die in Abbildung 4.34 gezeigten Beispielbilder für die morphologische Punktbewertung sollen verdeutlichen, dass die hergestellten rBMSC Aggregate teilweise schlechte morphologische Eigenschaften, wie ausgefranste Ränder oder lockere Struktur, aufwiesen, was auf die erhöhte Passagenanzahl und die vorangegangenen Prozeduren der Virustransduktion zurückzuführen sein könnte.

In unseren Versuchen konnte an Tag 14 der chondrogenen Differenzierung, der Aggregat-Durchmesser durch eine Sox9 Überexpression signifikant vergrößert werden (Abb. 4.35). Nach 28 Tagen war dieser Effekt jedoch aufgrund der interexperimentellen Schwankungen nur noch tendenziell zu erkennen. Im Gegensatz zu den Daten der Arbeitsgruppe um Kupcsik et al. lassen unsere Ergebnisse, zusammen mit denen von Venkatesan et al. (Venkatesan, Ekici et al. 2012), auf verstärkte Proteoglykansynthese durch eine Sox9 Überexpression schließen, was wir durch die Auswertung der Proteoglykanfärbung beweisen konnten (Abb. 4.36 A, B). Die Intensität der Färbung war dabei deutlich stärker, wie auch der Abstand zwischen den Zellkernen und die Integrität der glatten Randzone der Aggregate. Dies liegt vermutlich an der verstärkten Expression von Matrixproteinen. Diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Arbeitsgruppen bezüglich der Proteoglykansynthese sind vermutlich auf die Speziesunterschied, wie auch auf die unterschiedlichen viralen Vektorsysteme, die Passagenanzahl der MSC und die Stärke der veränderten Sox9 Dosis, zurückzuführen.

Wurden +SOX9 Aggregate allerdings unter hypertrophen Bedingungen kultiviert, zeigte sich nach vier Wochen Kulturzeit kaum eine Alcianblau Färbung. Dies deutet auf eine verminderte Proteoglykansynthese, und somit auf eine schlechte Qualität der ECM-Struktur hin. Klaus von der Mark und seine Kollegen haben *in vivo* gezeigt, dass neugeborene Mäuse mit einer konditionalen Sox9 Überexpression in hypertrophen Chondrozyten (unter der Kontrolle eines Col10a1-Promotors), unter einem fast kompletten Fehlen von Knochenmark leiden, was vermutlich durch die verzögerte Vaskularisierung des hypertrophen Knorpels und der verzögerten Knorpelresorption verursacht wird. Dadurch war die enchondrale Ossifikation verzögert, sowie das Knochenwachstum reduziert (Hattori, Muller et al. 2010). Es muss hier allerdings erwähnt werden, dass *in vitro* und *in vivo* Systeme, genau wie die chondrogene Kultivierung von Chondrozyten und von MSC, nicht direkt vergleichbar sind und daher Unterschiede in den Ergebnissen nicht ungewöhnlich erscheinen.

In –SOX9 Aggregaten, unter hypertrophen Bedingungen, konnten wir eine Zunahme des Durchmessers im Gegensatz zu den Kontrollaggregaten feststellen. Folglich haben diese Zellen wahrscheinlich einen Vorteil beim Eintritt in die Hypertrophie. An Tag 28 zeigen –SOX9-Aggregate unter chondrogenen Bedingungen eine schlechte Morphologie der ECM (ausgefranster Rand,

durchscheinend und lockere ECM-Struktur) zusammen mit einem leicht erhöhten Durchmesser, was auf eine schlechte Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsion schließen lässt. Auch die Alcianblau Färbung der Schnitte von –SOX9 Aggregaten unter chondrogenen Bedingungen zeigt noch eng zusammen liegende Zellkerne und kaum Proteoglykansynthese. Zusammenfassend konnte in –SOX9-Aggregaten unter chondrogenen Bedingungen eine deutliche Verschlechterung der ECM-Struktur beobachtet werden, was die Notwendigkeit der Sox9 Expression *in vitro* in MSC während der Chondrogenese vermuten lässt.

Unsere Genexpressionsdaten zeigen einen vorläufigen Trend, müssen aber noch durch weitere Versuche komplementiert werden. Die Regulierung von beispielsweise der Integrine alpha 10 und 11, sowie von N-cadherin und COMP, einem nicht-kollagenen Adaptermolekül, lassen aber schon erkennen, dass die Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion maßgeblich durch die Sox9-Dosis während der chondrogenen Differenzierung beeinflusst wird.

Grundsätzlich ist anzunehmen, dass die von uns verwendeten rBMSC ein eingeschränktes chondrogenes Potential haben. Dies liegt zum einen vermutlich an ihrer relativ hohen Passage sowie an der viralen Transduktion und möglicherweise an dem anschließenden Selektionsprozess. Auch durch eine Überexpression von Sox9 lässt sich dieser Effekt nur teilweise kompensieren und eine Inhibition von Sox9 potenziert die ohnehin schlechte ECM-Struktur der Aggregate um ein Vielfaches.

5.5 Die Rolle von Sox9 im p38 MAPK-Signalweg

In Absatz 5.3 wurde bereits die posttranslationale Modifikation von Cyclin D1, also die Stabilisierung des Proteins, sowie die posttranskriptionale Modifikation der *C/EBPβ* mRNA (Destabilisierung) nach einem Sox9 *Knockdown* diskutiert. Wir konnten den p38 MAPK-Signalweg als potentiellen (Mit-) Regulator dieser Effekte in -SOX9 rBMSC identifizieren.

Für die Regulierung der Cyclin D1 Expression gibt es verschiedene molekulare Mechanismen, darunter die Steuerung der Transkription, der mRNA Stabilität, der Proteinstabilität, der subzellulären Lokalisation und der Assoziation mit anderen Proteinen (Yang, Hitomi et al. 2006).

Mit unseren Versuchen konnten wir eine Änderung der Proteinstabilität, hin zu verlängerter Halbwertszeit, für Cyclin D1 in –SOX9 rBMSC, verglichen mit Kontrollen oder auch +SOX9 rBMSC, nachweisen. Es ist bekannt, dass eine zellzyklusabhängige Degradation von Cyclin D1 durch GSK3β vermittelt werden kann (Diehl, Cheng et al. 1998). Unsere Untersuchungen ergaben allerdings keinen Hinweis auf eine potentielle Regulation von GSK3β (Abb. 4.24). Ebenso zeigte die Inhibition von MEK1/2 keine Änderung der differentiellen Cyclin D1 Expression in –SOX9 MSC (Abb. 4.23).

Unsere Ergebnisse beweisen allerdings, dass ein hoher Cyclin D1 Level mit einer gehemmten p38 Aktivierung einher geht, wie wir für –SOX9 Zellen zeigen konnten. Der Abbau von Cyclin D1 erfolgte in diesen Zellen langsamer im Vergleich zu Kontroll- und +SOX9 Zellen. Wir haben die Protein-Neusynthese sechs Stunden lang durch Cycloheximidzugabe blockiert und dabei beobachtet, dass in Kontroll- und +SOX9 Zellen das Phospho-p38 (p-p38) zu Gesamt-p38 (t-p38) Verhältnis einen starken Anstieg nach etwa zwei Stunden erreicht. Dagegen konnte kaum eine Veränderung des p-p38/t-p38 Verhältnis in –SOX9 Zellen während des Versuchsverlaufs detektiert werden. Es kommt also zu keiner

zusätzlichen Aktivierung von p38 wenn Sox9 inhibiert ist und vermutlich dadurch zu der verlangsamten Cyclin D1-Degradation, was wir mittels Immunoblot nachweisen konnten.

Von Tew und Hardingham wurde berichtet, dass durch den p38 MAPK-Signalweg die Sox9 mRNA in adulten artikulären Chondrozyten stabilisiert wird (Tew and Hardingham 2006). Es ist also möglich, dass es eine gegenseitige Wechselwirkung beziehungsweise einen Feedbackmechanismus zwischen Sox9 und p38 gibt, um die Sox9 Dosis zu kontrollieren. Fehlendes Sox9 hemmt die Aktivierung von p38, wie wir zeigen konnten, wodurch es in der Folge zu einer verminderten Stabilität der Sox9 mRNA kommen könnte und so der Sox9 Level weiter abfällt. So könnte beispielsweise der zeitlich korrekte Rahmen von Differenzierungsereignissen sichergestellt werden.

Die Fähigkeit des p38 MAPK-Signalweg die Cyclin D1-Degradation zu initiieren, konnte auch für andere Zellen bereits gezeigt werden. Eine Phäochromozytom Zelllinie (PC12), in der p38 MAPK überexprimiert wird, zeigt eine reduzierte Cyclin D1 Expression. Wird p38 allerdings mit einem spezifischen Inhibitor blockiert, kommt es zu verstärkter Cyclin D1 RNA- und Proteinexpression (Conrad, Rust et al. 1999). Während der embryonalen Chondrogenese kommt es natürlicherweise zu einem graduellen Anstieg der p38 Phosphorylierung. Inhibiert man allerdings p38 *in vitro* in murinen MSC-Aggregaten, wird die Sox9 Expression ebenso inhibiert (Oh, Chang et al. 2000). Während der enchondralen Ossifikation wird dann der Übergang von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten durch konstitutive Aktivierung von p38 verzögert, was gleichzeitig auch die Sox9 Genexpression beeinflusst, da diese in der hypertrophen Differenzierung unterdrückt wird. Daher ist es nicht überraschend, dass transgene Mäuse, mit einer konstitutiv aktiven Proteinkinase (MKK6), welche p38 aktiviert, einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie Mäuse, die Sox9 in Chondrozyten überexprimieren (Zhang, Murakami et al. 2006).

Sox9 ist also zusammen mit p38 von zentraler Bedeutung für die Chondrogenese, wie auch für die Regulierung der Zellvitalität in MSC, letzteres, wie wir zeigen konnten, vermittelt über Cyclin D1.

Es wurde auch für den Verlauf der adipogenen Differenzierung ein positiver Effekt von p38 von Engelman et al. beschrieben (Engelman, Lisanti et al. 1998). Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der C/EBP Familie wird durch Phosphorylierung von MAPKs reguliert. P38 kann C/EBP β direkt phosphorylieren und somit aktivieren (Horie, Ishida et al. 2007).

In –SOX9 rBMSC fanden wir eine deutliche Reduktion des C/EBP β Proteinlevels, wie auch eine destabilisierte mRNA von C/EBP β . Da in –SOX9 rBMSC die Aktivierung von p38 reprimiert ist, ist denkbar, dass nicht nur eine verringerte C/EBP β Proteinmenge, sondern auch eine verminderte Aktivität des verbleibenden C/EBP β gefunden werden könnte. Ähnliches zeigen p38/- Kardiomyozyten, in denen die C/EBP β Bindeaktivität an den *Col1a1* Promotor stark reduziert ist (Ambrosino, Iwata et al. 2006).

Als Antwort auf Stresssignale aus der Umwelt, wie ultraviolette Strahlung oder Entzündungszytokine, reagiert der p38 MAPK-Signalweg zum Beispiel durch Änderung der mRNA Stabilität seiner Zielgene (Dean, Sully et al. 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl C/EBP β , wie auch sein naher Verwandter C/EBP δ , durch p38-vermittelte Änderung ihrer mRNA Stabilität reguliert werden können (Li, Si et al. 2008), was wir auch als Mechanismus in –SOX9 rBMSC vermuten. Es kam in unseren Versuchen zu einem schnelleren Abbau der C/EBP β mRNA und vermutlich somit auch zu der

verringerten Proteinsynthese von *C/EBP β* in –SOX9 Zellen, wofür wir die veränderte p38-Aktivität als Ursache vorschlagen.

Zusammenfassend nehmen wir also auf Grund unserer Daten einen p38-vermittelten Einfluss von Sox9 auf die Adipogenese mittels *C/EBP β* mRNA Destabilisierung an. Diese geht einher mit einem p38-vermittelten Einfluss von Sox9 auf die Osteogenese via Osteocalcin, wie auch auf die Zellvitalität von rBMSC, beides vermittelt durch Cyclin D1 Stabilisierung. Zusammen mit den Ergebnissen von Song und Kollegen, die einen Einfluss von Sox9 auf die ECM-Synthese in Chondrozyten via dem p38 MAPK-Signalweg als Antwort auf Glucokortikoide postulieren (Song, Zhang et al. 2012) und unseren Daten einer verminderten ECM-Integrität in –SOX9 rBMSC während der Chondrogenese, kann also ein Einfluss von Sox9 über den p38 MAPK-Signalweg auf die drei Hauptdifferenzierungspfade (Chondrogenese, Adipogenese, Osteogenese) von mesenchymalen Stammzellen, sowie auf Proliferation und Apoptose via Cyclin D1, postuliert werden.

Zusammenfassung

Sox9 ist der wichtigste Transkriptionsfaktor für die frühe Chondrogenese während der embryonalen Skelettentwicklung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sox9 einen p38-MAPK-vermittelten Einfluss auf die Zellvitalität von undifferenzierten adulten MSC, insbesondere auf die Proliferation sowie die Apoptose und gleichzeitig auf ihr Potential zu Adipo-, Osteo-, und Chondrozyten zu differenzieren, hat.

Über eine Caspase 3/7-Bcl-2-Bax-abhängige Kaskade, sowie durch die Akkumulation von p21 im Kern, induziert die Inhibition von Sox9 eine verstärkte apoptotische Aktivität. Das nukleäre p21 wirkt inhibierend auf den Zellzyklus und führt zu einem verzögerten S-Phase Eintritt, was in einer verminderten Proliferationsrate resultiert. Die Erhöhung der p21 Expression ist dabei Cyclin D1-abhängig. Das Cyclin D1 Protein wiederum wird durch eine verminderte Aktivierung (Phosphorylierung) von p38 stabilisiert und hat durch die Regulierung der Osteocalcin Expression einen Einfluss auf das osteogene Differenzierungspotential von MSC. Dieser pro-osteogene Effekt, genau wie die Inhibition der Proliferation als Folge einer Sox9 Inhibition, konnte auch für ASC gezeigt werden. Es scheint sich dabei also um einen allgemein gültigen Mechanismus zu handeln, ungeachtet des Ursprungs der MSC. Für die Induktion der Apoptose traf dies interessanterweise nicht zu und konnte nur in BMSC beobachtet werden.

Ebenso wird C/EBP β , ein Schlüsseltranskriptionsfaktor der Adipogenese, vermutlich durch p38-abhängige mRNA Destabilisierung reprimiert, was zu einer reduzierten adipogenen Differenzierungskapazität führt. Die Reduktion von C/EBP β könnte außerdem, über direkte Bindung, zur Reduktion von Bcl-2 führen und damit auch zur verstärkten apoptotischen Aktivität beitragen und letztendlich zur verlangsamten Proliferation durch die Regulierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (TFs) (Pal, Janz et al. 2009).

Der negative Einfluss einer Sox9 Inhibition auf die frühe chondrogene Differenzierungsfähigkeit konnte in einem 3D-Kulturmodell durch veränderte Expression von *Comp* und *Integrin alpha 11*, sowie durch Größenänderung und morphologische Bewertung der Aggregate, gezeigt werden.

Die Ergebnisse wurden in der Abbildung A schematisch zusammengefasst.

Mit unseren Ergebnissen beweisen wir, dass Sox9 mehr als der chondrogene Schlüsseltranskriptionsfaktor ist. Sox9 stellt einen Link zwischen Differenzierung, Proliferation und Apoptose in adulten undifferenzierten MSC dar. Über wichtige Zellzyklusregulatoren und den p38-MAPK-Signalwege kann Sox9 verschiedene zelluläre Funktionen beeinflussen, was eine wichtige Rolle bei der Regeneration von adulten Geweben und Organen spielt. Die dem zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen genau zu verstehen, ist von großer Bedeutung und die Voraussetzung, um in Zukunft theoretisch eine MSC-basierte Therapie muskuloskelettaler Traumata möglich zu machen.

Sox9 in MSC einzubringen wirkt sich im Allgemeinen positiv auf die Zellvitalität aus, indem das Wachstum gesteigert und gleichzeitig die Apoptose unterdrückt wird. Sox9 bringt allerdings genau dadurch auch das Potential mit sich, onkogen wirken zu können. Es erfordert noch weitere Studien, unter anderem auch im humanen System, um genauere Erkenntnisse über das kanzerogene Potential der Sox9 Dosis in MSC zu erlangen.

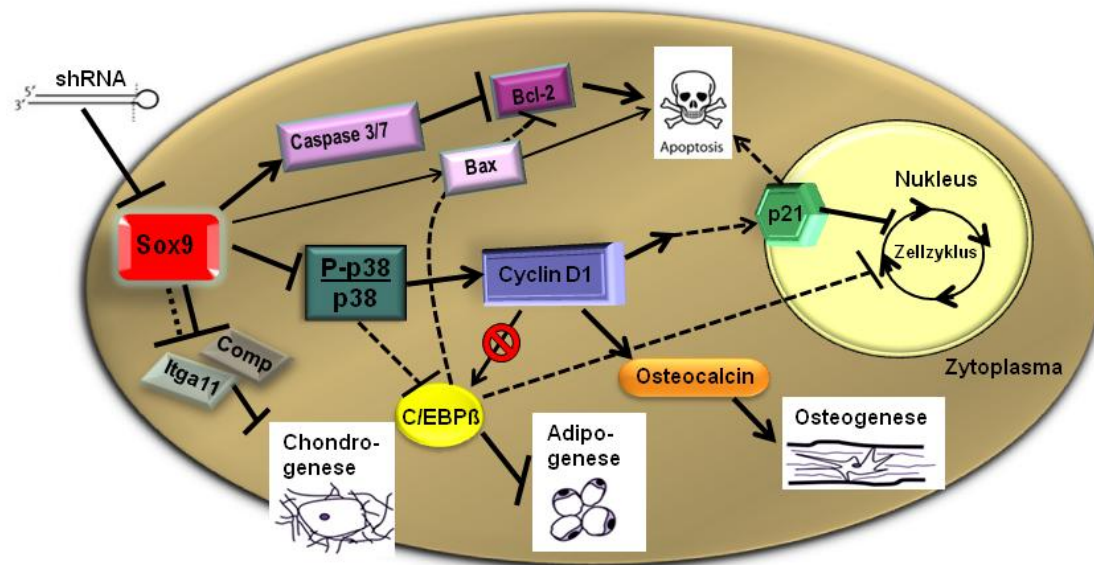


Abbildung A Schematische Darstellung der Ergebnisse nach Sox9 Inhibition in rBMSC. Als Folge einer Sox9 Inhibition wird die Caspase 3 und 7 Aktivität verstärkt, dadurch das anti-apoptotische Protein Bcl-2 reprimiert und gleichzeitig Bax, ein pro-Apoptose Protein, leicht induziert. Das Bax/Bcl-2 Verhältnis ist dadurch erhöht und es kommt zu verstärkter Apoptose in den Zellen. Verminderte Aktivierung (Phosphorylierung) von p38 trägt zur Stabilisierung von Cyclin D1 bei, was wiederum die Osteocalcin Expression und somit das osteogene Differenzierungspotential, sowie die p21 Expression, und vermutlich auch die p21 Lokalisierung, beeinflusst. Nukleäre Akkumulation von p21 wirkt am Übertritt von G1- zu S-Phase inhibierend auf den Zellzyklus, was zu einem verlangsamten Wachstum führt. Gleichzeitige Inhibition der C/EBP β Proteinsynthese, vermutlich vermittelt durch p38-abhängige mRNA Destabilisierung, resultiert in einem reduzierten adipogenen Differenzierungsvermögen der -SOX9 rBMSC. Die verringerte C/EBP β Aktivität könnte außerdem, durch direkte Bindung, zu einer Bcl-2 Reduktion beitragen und somit zur verstärkten Apoptose. Über Proliferations-assoziierte Transkriptionsfaktoren wirkt C/EBP β darüber hinaus auch auf das verlangsamte Zellwachstum (Pal et al. 2009). Die frühe Chondrogenese ist durch verringerte Expression des ECM-Moleküls *Comp* und des Adaptermoleküls *Itga11* in -SOX9 rBMSC gestört und resultiert in lockerer ECM-Struktur.

Summary

Sox9 is a key transcription factor in early chondrogenesis with distinct roles in differentiation processes during embryonic development. Here, we report that Sox9 modulates, via the p38 MAPK pathway, on the one hand cell viability in adult mesenchymal stem cells (MSC), especially by affecting proliferation and apoptotic activity, and on the other hand the differentiation capacity of MSC.

The inhibition of Sox9 activates apoptosis through a caspase 3/7-Bcl-2-Bax-dependent mechanism and, in addition, through accumulation of p21 in the nucleus. Nuclear p21 inhibits the cell cycle progression and leads to a decrease of the S-phase population and subsequently to a decrease in proliferation. The p21 induction in Sox9 knockdown cells is Cyclin D1-dependent. The Cyclin D1 protein in turn, is stabilized via impaired activation (phosphorylation) of p38. Cyclin D1 affects the regulation of Osteocalcin and by that, alters the osteogenic differentiation potential of MSC. This pro-osteogenic effect, as well as the inhibition of proliferation was also detected in ASC after silencing Sox9. Therefore, this mechanism seems to be universal, regardless of the source of MSC. Notably, induction of apoptotic activity after Sox9 knockdown could only be measured in BMSC, but not in ASC. The adipogenic differentiation capacity is impaired by strong reduction of C/EBP β , probably via p38-mediated mRNA destabilization. Reduction of C/EBP β may also inhibit the anti-apoptotic gene *Bcl-2* via direct binding and thus, contributes to increased apoptosis and, ultimately, to decreased proliferation via regulation of other proliferation associated transcription factors (Pal, Janz et al. 2009). The negative impact of Sox9 inhibition on early chondrogenic differentiation could be shown in a 3D culture aggregate model by altered expression of *Comp* and *Integrin alpha 11*, as well as by analysis of the diameter and the morphology of the aggregates. The results are summarized in figure A.

Our results show that Sox9 is more than only the chondrogenic master transcription factor. We identified Sox9 as an important link between differentiation, proliferation and apoptosis in undifferentiated mesenchymal stem cells. Moreover, we emphasize the importance of the delicate balance of a precisely regulated Sox9 activity in MSC, not only for proper skeletal development during embryogenesis, but likely also for successful repair and regeneration of tissues and organs in adults. For that, it is necessary to understand the biology of mesenchymal stem cells completely and in detail for a possible future safe application of MSC in musculoskeletal traumata.

There are some advantages by using Sox9 as a transgene in MSC, concerning the cell viability of rBMSC, as cell growth is activated and apoptosis reduced. But as Sox9 promotes proliferation and decreases cell death, there is a strong potential to function as a pro-oncogenic factor.

Further studies are needed, among others in the human model, to obtain more information about the cancerogenic potential of the Sox9 dose in adult MSC.

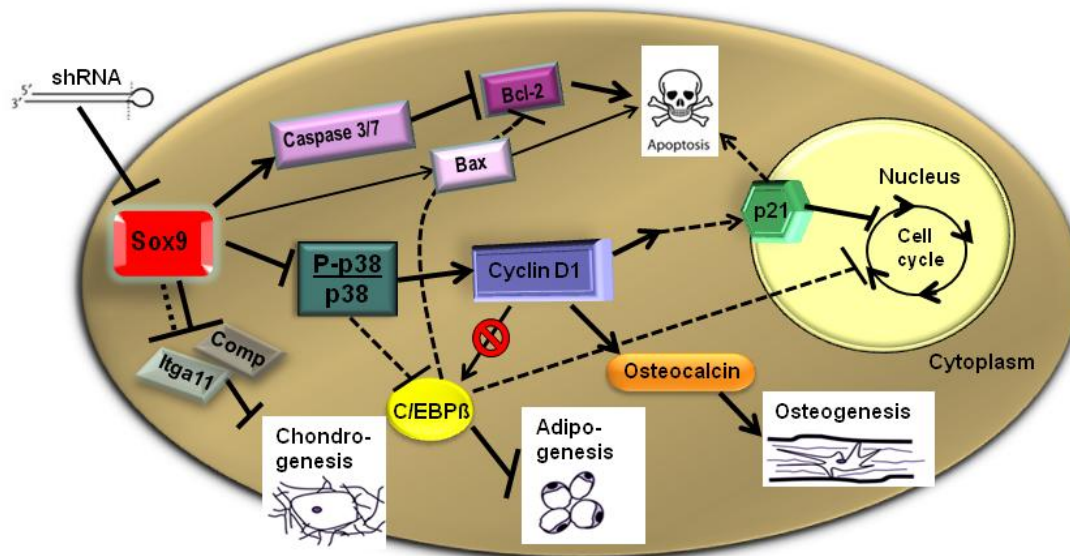


Figure A) Schematic illustration of processes occurring after Sox9 inhibition in rBMSC. Anti-apoptotic protein Bcl-2 is down regulated, probably through increased caspase 3/7 activity and Bax is slightly induced, thus, the Bax/Bcl-2 ratio increases in -SOX9 rBMSC, and, as a consequence, apoptosis is enhanced. Impaired p38 activation (phosphorylation) contributes to the stabilization of Cyclin D1, which then affects p21 expression and its subcellular localization, as well as the production of Osteocalcin, what in turn affects the osteogenic differentiation potential. Increased nuclear accumulation of p21 subsequently inhibits the cell cycle progression by retaining cells at the G1-S-phase transition point, resulting in decreased proliferation. Concomitant repression of C/EBP β protein synthesis, probably mediated by p38-dependent mRNA destabilization, leads to reduced adipogenic differentiation capacity of rBMSC. Reduction of C/EBP β activity may also reduce Bcl-2 by direct binding and thus, contribute to increased apoptosis and ultimately to decreased cell number and decreased proliferation capacity through regulation of proliferation-associated transcription factors (TFs) (Pal et al. 2009). The early chondrogenesis is impaired via decreased expression of the ECM molecule *Comp* and the adaptor molecule *Itga11* in -SOX9 rBMSC, resulting in a loose ECM structure.

Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes gilt mein Dank Frau **Prof. Dr. Susanne Grässel** (Abteilung für Orthopädische Forschung am Universitätsklinikum Regensburg), die mir die Möglichkeit gegeben hat diese Dissertation zu erstellen. Ich bedanke mich für die engagierte und kompetente Anleitung und Betreuung, für viele hilfreiche Diskussionen und Ideen, die den Entstehungsprozess meiner Arbeit maßgeblich geformt haben, für die Förderung zur Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen, sowie im Besonderen für das Vertrauen in mich, die gute Zusammenarbeit, die stete Unterstützung und die schönen Grillfeste.

Bei Herrn **Prof. Achim Göpferich** (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie an der Universität Regensburg) bedanke ich mich ganz herzlich, dass er die Betreuung sowie das Erstgutachten dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Regensburg übernommen hat.

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Dr. Joachim Grifka** (Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik für die Universität Regensburg im Asklepios Zentrum Bad Abbach) für die Möglichkeit an seinem Institut diese Dissertation zu erstellen und für sein Interesse an der Grundlagenforschung.

Frau **Prof. Dr. Anja Bosserhoff** danke ich für Ihre wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionen, die das Gelingen dieser Arbeit positiv beeinflusst und vorangetrieben haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn **PD Dr. Richard Bauer** ganz herzlich bedanken, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte, für viele Diskussionen, die mir in der Weiterentwicklung meiner Arbeit geholfen haben und außerdem für die zahlreichen, humorvollen gemeinsamen Stunden, die nachbarschaftliche Hilfe und Freundschaft während der letzten Jahre.

Zu großem Dank bin ich auch dem gesamten Laborteam der Orthopädie verpflichtet. Insbesondere danke ich von ganzem Herzen Frau **Claudia Göttl** und Frau **Mandy Vogel** für die herausragende praktische Unterstützung, für viele erlernte Methoden und Arbeitstechniken und nicht zuletzt für das tolle Arbeitsklima. Ich bin sehr dankbar, dass vor allem Frau **Claudia Göttl** mich, nach kurzer Pause 2010, wieder durch die Endphase meiner Dissertation begleitet hat. Ohne sie wäre dieses Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich bei allen **Mitarbeitern des ZMB** im Biopark, insbesondere bei **Anja Pasoldt**, **Dr. Julia Lorenz** und **Nicole Schäfer** für ihre fachliche, wie auch freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mir diesen Weg überhaupt erst ermöglicht haben und immer hinter mir stehen, möchte ich auch hier besonders dafür danken. Ebenso meinen **Schwiegereltern**, die mich herzlich in die Familie aufgenommen haben, gebührt mein Dank. Für ihre langjährige wundervolle Freundschaft und Unterstützung danke ich auch **Steffi**, **Verena**, **Andrea** und **Theresa**.

Mein größter und herzlichster Dank gilt aber meinem Mann **Mathias**, der seit vielen Jahren der Mittelpunkt meines Lebens ist und mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.

Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Ort, Datum

Sabine Stöckl

Lebenslauf (Curriculum vitae)

SABINE STÖCKL

**CERTIFIED BIOLOGIST
(DIPLOM-BIOLOGIN UNIV.)**

Date of Birth: 08/10/1982

Orthopaedic Surgery, Experimental Orthopaedics, University of Regensburg, Regensburg, Germany

| phone +49 941 943 1626 | fax +49 941 943 5066 | sabine.stoeckl@klinik.uni-regensburg.de

EDUCATION

- **2008 - 2013 PhD thesis:** „The impact of Sox9 on cell viability and differentiation capacity of adult mesenchymal stem cells” (“Der Einfluss von Sox9 auf Zellvitalität und Differenzierungspotential von adulten mesenchymalen Stammzellen”), University of Regensburg, Orthopaedic surgery; Supervisor: Prof. Susanne Grässel
- **03/2007 – 03/2008 Diploma thesis:** “Genetic studies linking protein synthesis and cell division” (Genetische Studien zur Kopplung von Proteinsynthese und Zellgröße), University of Regensburg, Department of Genetics; Supervisor: Prof. Wolfgang Seufert
- **10/2004 – 03/2008 Studies in biology**, University of Regensburg; Graduated with diploma in biology (Diplom- Biologin Univ.); Final grade: 1,3
- **10/2002 – 10/2004 Studies in cell biology**, University of Osnabrück

ORAL PRESENTATIONS at scientific meetings

- **6th Hartl-Symposium on Rheumatology and 6th Symposium of the DFG Research Unit FOR696, 2012**, Regensburg, Germany; Oral presentation: Sox9 regulates mesenchymal stem cells
- **Joint BSMB/DGBF Meeting 2012**, Oxford, GB; Oral presentation: *In vitro* knockdown of Sox9 affects cell survival via p21 and Cyclin D1 and favors osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC)
- **DKOU 2011**, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (German convention of orthopaedics and trauma surgery), Berlin, Germany; Oral presentation: Die Inhibition des Transkriptionsfaktors Sox9 beeinflusst Proliferation, Apoptose und osteogenes Differenzierungspotential von MSC (Inhibition of Sox9 affects proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation capacity of MSC)
- **OARSI 2011**, Osteoarthritis research society international, San Diego, USA; Oral presentation, session “highest rated abstracts”: *In vitro* knockdown of Sox9 affects cell survival via p21 and Cyclin D1 and favors osteogenic differentiation of MSC
- **DGBF 2011**, Cologne, Germany; Oral presentation: Sox9 is involved in proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation of rat MSC
- **XXII FECTS Meeting 2010**, Davos, Switzerland; Oral presentation: *In vitro* gene knockdown of Sox9 affects cell survival and osteogenic differentiation of rMSC
- **DKOU 2010**, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (German convention of orthopaedics and trauma surgery), Berlin, Germany; Oral presentation: *In vitro* inhibition von Sox9 reduziert die Bcl-2 Expression (*In vitro* knockdown of Sox9 decrease the expression of Bcl-2)

- Second Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies 2009, Reims, France; Oral presentation: *In vitro* gene knockdown of the transcription factor Sox9 in MSC
- DKOU 2008, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (German convention of orthopaedics and trauma surgery), Berlin, Germany; Oral presentation: Sox9 Gen-knockdown *in vitro*: Evaluation verschiedener experimenteller Ansätze (Sox9 gene-knockdown: evaluation of experimental approaches)

AWARDS and STIPENDIA

- OARSI 2011, San Diego, USA: Young Investigator Travel Award for best rated abstract (1000 \$)
- GlaxoSmithKline Foundation, Travel grant for OARSI 2010, Brussels, Belgium; Poster presentation: *In vitro* gene knockdown of Sox9 affects cell survival and osteogenic differentiation of rMSC
- Foundation of advancement of women, University of Regensburg, Travel grant for the XXII FECTS Meeting, Davos, Switzerland, 2010
- GlaxoSmithKline Foundation, Travel grant for the Second Joint Mtg. of the French and German Connective Tissue Societies, Reims, France, 2009

ABSTRACTS

Stöckl S., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 affects cell survival and osteogenic differentiation of rMSC. Osteoarthritis Cartilage, 19, Suppl.1:S29, 2011

Stöckl S., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 in rat MSC affects *Bcl2* expression. European Journal of Cell Biology 89, Suppl. 1: S14, 2010

Stöckl S., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 in rat MSC affects cell cycle progression. Osteoarthritis Cartilage, 17, Suppl. 1: S260-261, 2009

PUBLICATIONS

Stöckl S., Bauer R., Bosserhoff A., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells; J Cell Sci. 2013 Jul 1;126(Pt 13):2890-2902.

Stöckl S., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: Sox9 modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells; Cell.Physiol.Biochem. 2013;31(4-5):703-17

Grässel S., **Stöckl S.**, Jenei-Lanzl Z.: Isolation, culture and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells; Methods Mol Biol. 2012;879:203-67

Veröffentlichungen

Journal paper

1. **Stöckl S.**, Bauer R., Bosserhoff A., Göttl C., Grifka J., Grässel S.: Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells; J Cell Sci. 2013 Jul 1;126(Pt 13):2890-2902.
2. **Stöckl S.**, Göttl C., Grifka J., Grässel S.: Sox9 modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells; Cell.Physiol.Biochem. 2013;31(4-5):703-17
3. Grässel S., **Stöckl S.**, Jenei-Lanzl Z.: Isolation, culture and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells; Methods Mol Biol. 2012;879:203-67

Abstracts

1. **Stöckl S.**, Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 affects cell survival and osteogenic differentiation of rMSC. Osteoarthritis Cartilage, 19, Suppl.1:S29, 2011
2. **Stöckl S.**, Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 in rat MSC affects Bcl2 expression. European Journal of Cell Biology 89, Suppl. 1: S14, 2010
3. **Stöckl S.**, Göttl C., Grifka J., Grässel S.: *In vitro* gene knockdown of Sox9 in rat MSC affects cell cycle progression. Osteoarthritis Cartilage, 17, Suppl. 1: S260-261, 2009

Abkürzungsverzeichnis

a2P	Adipocyte protein 2
Ac	Acetylierung
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
ADD1	Adipocyte determination and differentiation factor 1
ALP	Alkalische Phosphatase
AMH	Anti-Müllersches-Hormon
ASC	Adipose-derived mesenchymal stem cells
BCA	Bicinchoninsäure
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMPs	Bone morphogenic proteins
BMSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serum-Albumin
BSP	Bone sialoprotein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Cbfa1 (=Runx2)	core binding factor alpha1 subunit protein
CBP	CREB binding protein
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
Cdrap	cartilage derived retinoic acid sensitive protein
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CFU	Colony forming units
CH3	third constant H chain domain
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CIP	calf-intestinal-phosphatase
Col11a2	Kollagen Typ 11 alpha 2
Col1a1	Kollagen Typ 1 alpha 1
Col2a1	Kollagen Typ 2 alpha 1
Col9a2	Kollagen Typ 9 alpha 2
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CREB	cAMP response element-binding protein
CTD	carboxy-terminal domain (=RNA Polymerase II)
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
Ddit3	DNA damage inducible transcript 3
Dlx5	distal-less homeobox 5
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal-regulated-kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor

Abkürzungsverzeichnis

FKS	fötales Kälberserum
Gpr132	G-protein-coupled receptor 132
GSK3-beta	Glycogen-Synthase-Kinase-3-beta
H ₂ O	Wasser
HA	Hyaluronsäure
HAT	Histon Acetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff
HIF1 α	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
HLA-DR	human leukocyte antigen D-related
HMG	high mobility group
HRP	Horseradish peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IHH	Indian Hedgehog
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobase
KLF5	Kruppel-like-factor 5
LB	lysogeny broth
LPC	Lysophosphatidylcholines
LPL	Lipoprotein lipase
LRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
MACT	Matrix-assoziierte Autologe Chondrozyten Transplantation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	Multiple cloning site
Med12	mediator complex subunit 12
Med25	mediator complex subunit 25
MH2	MAD homology 2
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymal stem cell
Msx2	msh homeobox 2
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
OCT	Osteochondrale Transplantation
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Pgc1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
Pik3ca	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PKA	Protein Kinase A
PPAR- γ	peroxisome proliferator activator receptor γ
PQA	Prolin/Glutamin/Alanin
PQS	Prolin/Glutamin/Serin
Pref-1	Preadipocyte factor-1
PTHrP	Parathyroid hormone-related peptide

qPCR	quantitative Polymerase chain reaction
RIN	RNA Integrity Number
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamine
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
Runx2	runt related transcription factor 2
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression
Scx	Scleraxis
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF1	splicing factor 1
shRNA	short/small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Slfn1	Schlafen 1
SOX	SRY-related high-mobility group [HMG] box
SP1	specificity protein 1
SRY	Sex-determining region Y
T3	Triiodothyronin
TA	Transaktivierung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TGF- β	Transforming growth factor β
Tip60	Tat interacting protein, 60kD
TLE	Transducin-like enhancer
TMB	tetramethylbenzidin
Wnt	Wingless and Int-1
Wwp2	WW (Tryptophan) domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2

Literaturverzeichnis

- Abdel-Samad, R., H. Zalzal, et al. (2011). "MiniSOX9, a dominant-negative variant in colon cancer cells." *Oncogene* **30**(22): 2493-2503.
- Ahmed, N., B. Vogel, et al. (2006). "CD45-positive cells of haematopoietic origin enhance chondrogenic marker gene expression in rat marrow stromal cells." *Int J Mol Med* **18**(2): 233-240.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." *Genes Dev* **16**(21): 2813-2828.
- Akiyama, H. and V. Lefebvre (2011). "Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis." *J Bone Miner Metab* **29**(4): 390-395.
- Akiyama, H., J. P. Lyons, et al. (2004). "Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation." *Genes Dev* **18**(9): 1072-1087.
- Alao, J. P. (2007). "The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention." *Mol Cancer* **6**: 24.
- Aleman, A., L. Adrien, et al. (2008). "Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays." *Br J Cancer* **98**(2): 466-473.
- Amarilio, R., S. V. Viukov, et al. (2007). "HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis." *Development* **134**(21): 3917-3928.
- Ambrosino, C., T. Iwata, et al. (2006). "TEF-1 and C/EBPbeta are major p38alpha MAPK-regulated transcription factors in proliferating cardiomyocytes." *Biochem J* **396**(1): 163-172.
- Asada, M., T. Yamada, et al. (1999). "Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation." *EMBO J* **18**(5): 1223-1234.
- Augello, A. and C. De Bari (2010). "The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells." *Hum Gene Ther* **21**(10): 1226-1238.
- Baksh, D., G. M. Boland, et al. (2007). "Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation." *J Cell Biochem* **101**(5): 1109-1124.
- Barrionuevo, F. and G. Scherer (2010). "SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(3): 433-436.
- Bastide, P., C. Darido, et al. (2007). "Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium." *J Cell Biol* **178**(4): 635-648.
- Bell, D. M., K. K. Leung, et al. (1997). "SOX9 directly regulates the type-II collagen gene." *Nat Genet* **16**(2): 174-178.
- Benjamin, M. (1990). "The cranial cartilages of teleosts and their classification." *J Anat* **169**: 153-172.
- Bernard, P., P. Tang, et al. (2003). "Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination." *Hum Mol Genet* **12**(14): 1755-1765.
- Bi, W., J. M. Deng, et al. (1999). "Sox9 is required for cartilage formation." *Nat Genet* **22**(1): 85-89.
- Bialek, P., B. Kern, et al. (2004). "A twist code determines the onset of osteoblast differentiation." *Dev Cell* **6**(3): 423-435.
- Bianco, P., X. Cao, et al. (2013). "The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine." *Nat Med* **19**(1): 35-42.
- Boland, G. M., G. Perkins, et al. (2004). "Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem* **93**(6): 1210-1230.
- Boudreau, N., Z. Werb, et al. (1996). "Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3509-3513.

- Bowles, J., G. Schepers, et al. (2000). "Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators." *Dev Biol* **227**(2): 239-255.
- Brady, G., L. Boggan, et al. (2005). "Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1." *J Biol Chem* **280**(35): 30723-30734.
- Bruder, S. P., N. Jaiswal, et al. (1997). "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation." *J Cell Biochem* **64**(2): 278-294.
- Bruder, S. P., A. A. Kurth, et al. (1998). "Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* **16**(2): 155-162.
- Bunnell, B. A., M. Flaatt, et al. (2008). "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." *Methods* **45**(2): 115-120.
- Cai, C., H. Wang, et al. (2013). "ERG induces androgen receptor-mediated regulation of SOX9 in prostate cancer." *J Clin Invest* **123**(3): 1109-1122.
- Can, A. and S. Karahuseyinoglu (2007). "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells." *Stem Cells* **25**(11): 2886-2895.
- Chang, J., W. Sonoyama, et al. (2007). "Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK." *J Biol Chem* **282**(42): 30938-30948.
- Chen, W., C. C. Yang, et al. (2006). "Expression of sex-determining genes in human sebaceous glands and their possible role in the pathogenesis of acne." *J Eur Acad Dermatol Venereol* **20**(7): 846-852.
- Cheng, M., P. Olivier, et al. (1999). "The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts." *EMBO J* **18**(6): 1571-1583.
- Cmielova, J. and M. Rezacova (2011). "p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]." *J Cell Biochem* **112**(12): 3502-3506.
- Cole, A. G. (2011). "A review of diversity in the evolution and development of cartilage: the search for the origin of the chondrocyte." *Eur Cell Mater* **21**: 122-129.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al. (2003). "Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation." *EMBO J* **22**(9): 2036-2046.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al. (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 355-366.
- Conrad, P. W., R. T. Rust, et al. (1999). "Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells." *J Biol Chem* **274**(33): 23570-23576.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" *Trends Cell Biol* **13**(2): 65-70.
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem J* **429**(3): 403-417.
- da Silva Meirelles, L., A. I. Caplan, et al. (2008). "In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **26**(9): 2287-2299.
- Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." *Ann N Y Acad Sci* **1192**: 437-443.
- Darido, C., M. Buchert, et al. (2008). "Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells." *Cancer Res* **68**(11): 4258-4268.
- Davatchi, F., B. S. Abdollahi, et al. (2011). "Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients." *Int J Rheum Dis* **14**(2): 211-215.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis Rheum* **44**(8): 1928-1942.
- Dean, J. L., G. Sully, et al. (2004). "The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation." *Cell Signal* **16**(10): 1113-1121.

- Denicourt, C. and S. F. Dowdy (2004). "Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors." Genes Dev **18**(8): 851-855.
- Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-3511.
- Ducy, P., C. Desbois, et al. (1996). "Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice." Nature **382**(6590): 448-452.
- Dulic, V., G. H. Stein, et al. (1998). "Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition." Mol Cell Biol **18**(1): 546-557.
- Duttaroy, A., J. F. Qian, et al. (1997). "Up-regulated P21CIP1 expression is part of the regulation quantitatively controlling serum deprivation-induced apoptosis." J Cell Biochem **64**(3): 434-446.
- Dy, P., W. Wang, et al. (2012). "Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes." Dev Cell **22**(3): 597-609.
- Engelman, J. A., M. P. Lisanti, et al. (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." J Biol Chem **273**(48): 32111-32120.
- Etheridge, S. L., G. J. Spencer, et al. (2004). "Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells." Stem Cells **22**(5): 849-860.
- Evans, C. H., P. D. Robbins, et al. (1996). "Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis." Hum Gene Ther **7**(10): 1261-1280.
- Evans, C. H., P. D. Robbins, et al. (2005). "Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8698-8703.
- Fanburg-Smith, J. C., A. Auerbach, et al. (2010). "Reappraisal of mesenchymal chondrosarcoma: novel morphologic observations of the hyaline cartilage and endochondral ossification and beta-catenin, Sox9, and osteocalcin immunostaining of 22 cases." Hum Pathol **41**(5): 653-662.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science **279**(5356): 1528-1530.
- Ferron, M., E. Hinoi, et al. (2008). "Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5266-5270.
- Foster, J. W., M. A. Dominguez-Steglich, et al. (1994). "Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene." Nature **372**(6506): 525-530.
- Fraser, J. K., M. Zhu, et al. (2008). "Adipose-derived stem cells." Methods Mol Biol **449**: 59-67.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, et al. (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.
- Fu, M., M. Rao, et al. (2005). "Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment." J Biol Chem **280**(17): 16934-16941.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-5447.
- Fuster, J. J., P. Fernandez, et al. (2010). "Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies." Cardiovasc Res **86**(2): 254-264.
- Gasca, S., J. Canizares, et al. (2002). "A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11199-11204.
- Goldring, M. B., K. Tsuchimochi, et al. (2006). "The control of chondrogenesis." J Cell Biochem **97**(1): 33-44.
- Grassel, S. and N. Ahmed (2007). "Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation." Frontiers in Bioscience **12**: 4946-4956.

- Greenblatt, M. B., J. H. Shim, et al. (2010). "The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice." *J Clin Invest* **120**(7): 2457-2473.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." *Physiol Rev* **78**(3): 783-809.
- Gregory, C. A., H. Singh, et al. (2003). "The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow." *J Biol Chem* **278**(30): 28067-28078.
- Grogan, S. P., A. Barbero, et al. (2006). "Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage." *Tissue Eng* **12**(8): 2141-2149.
- Guo, X., L. Xiong, et al. (2012). "Expression features of SOX9 associate with tumor progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma." *Diagn Pathol* **7**: 44.
- Gutierrez, S., A. Javed, et al. (2002). "CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression." *J Biol Chem* **277**(2): 1316-1323.
- Hall, B. K. and T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." *Bioessays* **22**(2): 138-147.
- Harley, V. R., D. I. Jackson, et al. (1992). "DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females." *Science* **255**(5043): 453-456.
- Hartmann, C. and C. J. Tabin (2000). "Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb." *Development* **127**(14): 3141-3159.
- Hattori, T., C. Muller, et al. (2010). "SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification." *Development* **137**(6): 901-911.
- Havlas, V., P. Kos, et al. (2011). "[Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells]." *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* **78**(2): 138-144.
- Hollander, A. P., S. C. Dickinson, et al. (2010). "Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue." *Stem Cells* **28**(11): 1992-1996.
- Horch, R. E., U. Kneser, et al. (2012). "Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand?" *J Cell Mol Med* **16**(6): 1157-1165.
- Horie, R., T. Ishida, et al. (2007). "TRAF activation of C/EBPbeta (NF-IL6) via p38 MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages." *Microbes Infect* **9**(6): 721-728.
- Huang, B., S. Wang, et al. (1999). "Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9." *Am J Med Genet* **87**(4): 349-353.
- Huang, W., X. Zhou, et al. (2000). "Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer." *Mol Cell Biol* **20**(11): 4149-4158.
- Huang, Z., P. J. Hurley, et al. (2012). "Sox9 is required for prostate development and prostate cancer initiation." *Oncotarget* **3**(6): 651-663.
- Iglesias-Bartolome, R. and J. S. Gutkind (2011). "Signaling circuitries controlling stem cell fate: to be or not to be." *Curr Opin Cell Biol* **23**(6): 716-723.
- Ikegami, D., H. Akiyama, et al. (2011). "Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways." *Development* **138**(8): 1507-1519.
- Jansen, B. J., C. Gilissen, et al. (2010). "Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome." *Stem Cells Dev* **19**(4): 481-490.
- Javed, A., B. Guo, et al. (2000). "Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha))/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription." *J Cell Sci* **113** (Pt 12): 2221-2231.
- Jiang, S. S., W. T. Fang, et al. (2010). "Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity." *Clin Cancer Res* **16**(17): 4363-4373.
- Jilka, R. L., R. S. Weinstein, et al. (1998). "Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines." *J Bone Miner Res* **13**(5): 793-802.

- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *Exp Cell Res* **238**(1): 265-272.
- Kadiyala, S., R. G. Young, et al. (1997). "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro." *Cell Transplant* **6**(2): 125-134.
- Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." *Dev Cell* **2**(4): 389-406.
- Kayalar, C., T. Ord, et al. (1996). "Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 2234-2238.
- Kirsch, D. G., A. Doseff, et al. (1999). "Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c." *J Biol Chem* **274**(30): 21155-21161.
- Kordes, U. and C. Hagel (2006). "Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor." *J Neurooncol* **80**(2): 151-155.
- Kowaltowski, A. J., R. G. Cosso, et al. (2002). "Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function." *J Biol Chem* **277**(45): 42802-42807.
- Kretlow, J. D., Y. Q. Jin, et al. (2008). "Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells." *BMC Cell Biol* **9**: 60.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." *Nature* **423**(6937): 332-336.
- Kupcsik, L., M. J. Stoddart, et al. (2010). "Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering." *Tissue Eng Part A* **16**(6): 1845-1855.
- Lamb, J. and M. E. Ewen (2003). "Cyclin D1 and molecular chaperones: implications for tumorigenesis." *Cell Cycle* **2**(6): 525-527.
- Lamb, J., S. Ramaswamy, et al. (2003). "A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer." *Cell* **114**(3): 323-334.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* **260**(5110): 920-926.
- Laudes, M. (2011). "Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes." *J Mol Endocrinol* **46**(2): R65-72.
- Lee, N. K., H. Sowa, et al. (2007). "Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton." *Cell* **130**(3): 456-469.
- Lefebvre, V., P. Li, et al. (1998). "A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene." *EMBO J* **17**(19): 5718-5733.
- Lefebvre, V. and P. Smits (2005). "Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation." *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(3): 200-212.
- Li, B., J. Si, et al. (2008). "Ultraviolet radiation (UVR) activates p38 MAP kinase and induces post-transcriptional stabilization of the C/EBPdelta mRNA in G0 growth arrested mammary epithelial cells." *J Cell Biochem* **103**(5): 1657-1669.
- Lian, J. B., A. Javed, et al. (2004). "Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**(1-2): 1-41.
- Lian, J. B., J. L. Stein, et al. (2001). "Contributions of nuclear architecture and chromatin to vitamin D-dependent transcriptional control of the rat osteocalcin gene." *Steroids* **66**(3-5): 159-170.
- Ling, L., V. Nurcombe, et al. (2009). "Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells." *Gene* **433**(1-2): 1-7.
- Ling, S., X. Chang, et al. (2011). "An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer." *Cancer Res* **71**(11): 3812-3821.
- Liu, J. N., Y. M. Shang Guan, et al. (2012). "The evaluation of SOX9 expression and its relationship with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in gastric neoplastic and nonneoplastic lesions." *Ann Diagn Pathol* **16**(4): 235-244.
- Lu, B., Y. Fang, et al. (2008). "Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer." *Am J Clin Pathol* **130**(6): 897-904.

- Magne, D., C. Vinatier, et al. (2005). "Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage." Trends Mol Med **11**(11): 519-526.
- Mardaryev, A. N., N. Meier, et al. (2011). "Lhx2 differentially regulates Sox9, Tcf4 and Lgr5 in hair follicle stem cells to promote epidermal regeneration after injury." Development **138**(22): 4843-4852.
- McDowall, S., A. Argentaro, et al. (1999). "Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia." J Biol Chem **274**(34): 24023-24030.
- McKinlay, L. (2010). "SOX9 upregulation in lung adenocarcinoma." Thorax.
- Mead, T. J., Q. Wang, et al. (2013). "A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration." Nucleic Acids Res.
- Mertin, S., S. G. McDowall, et al. (1999). "The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins." Nucleic Acids Res **27**(5): 1359-1364.
- Meyer, J., P. Sudbeck, et al. (1997). "Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations." Hum Mol Genet **6**(1): 91-98.
- Mirando, A. J., T. Maruyama, et al. (2010). "beta-catenin/cyclin D1 mediated development of suture mesenchyme in calvarial morphogenesis." BMC Dev Biol **10**: 116.
- Moldes, M., Y. Zuo, et al. (2003). "Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis." Biochem J **376**(Pt 3): 607-613.
- Mueller, M. B. and R. S. Tuan (2008). "Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells." Arthritis Rheum **58**(5): 1377-1388.
- Murakami, N., T. Hashidate, et al. (2009). "Transcriptional regulation of human G2A in monocytes/macrophages: involvement of c/EBPs, Runx and Pu.1." Genes Cells **14**(12): 1441-1455.
- Murakami, S., V. Lefebvre, et al. (2000). "Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **275**(5): 3687-3692.
- Nakahara, H., J. E. Dennis, et al. (1991). "In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells." Exp Cell Res **195**(2): 492-503.
- Nasmyth, K. (1996). "Viewpoint: putting the cell cycle in order." Science **274**(5293): 1643-1645.
- Ng, L. J., S. Wheatley, et al. (1997). "SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse." Dev Biol **183**(1): 108-121.
- Oberlender, S. A. and R. S. Tuan (1994). "Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis." Development **120**(1): 177-187.
- Oeztuerk-Winder, F. and J. J. Ventura (2012). "The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation." Biochem J **445**(1): 1-10.
- Oh, C. D., S. H. Chang, et al. (2000). "Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, Erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes." Journal of Biological Chemistry **275**(8): 5613-5619.
- Oh, C. D., S. N. Maity, et al. (2010). "Identification of SOX9 interaction sites in the genome of chondrocytes." PLoS One **5**(4): e10113.
- Orozco, L., A. Munar, et al. (2013). "Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study." Transplantation **95**(12): 1535-1541.
- Otto, T. C. and M. D. Lane (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(4): 229-242.
- Pal, R., M. Janz, et al. (2009). "C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells." Blood **114**(18): 3890-3898.
- Panza, A., V. Paziienza, et al. (2013). "Interplay between SOX9, beta-catenin and PPARgamma activation in colorectal cancer." Biochim Biophys Acta **1833**(8): 1853-1865.
- Passeron, T., J. C. Valencia, et al. (2009). "Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid." J Clin Invest **119**(4): 954-963.
- Pearle, A. D., R. F. Warren, et al. (2005). "Basic science of articular cartilage and osteoarthritis." Clin Sports Med **24**(1): 1-12.

- Pereira, R. C., A. M. Delany, et al. (2004). "CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation." *Endocrinology* **145**(4): 1952-1960.
- Perlman, H., X. Zhang, et al. (1999). "An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis." *Cell Death Differ* **6**(1): 48-54.
- Piera-Velazquez, S., D. F. Hawkins, et al. (2007). "Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB." *Exp Cell Res* **313**(6): 1069-1079.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.
- Pritchett, J., V. Athwal, et al. (2011). "Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development." *Trends Mol Med* **17**(3): 166-174.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." *Science* **276**(5309): 71-74.
- Prockop, D. J. (2009). "Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms." *Mol Ther* **17**(6): 939-946.
- Prydz, K. and K. T. Dalen (2000). "Synthesis and sorting of proteoglycans." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 193-205.
- Raman, M., W. Chen, et al. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* **26**(22): 3100-3112.
- Ranta, F., J. Leveringhaus, et al. (2011). "Protein kinase C delta (PKCdelta) affects proliferation of insulin-secreting cells by promoting nuclear extrusion of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1." *PLoS One* **6**(12): e28828.
- Reed, S. I., E. Bailly, et al. (1994). "G1 control in mammalian cells." *J Cell Sci Suppl* **18**: 69-73.
- Reich, C. M., O. Raabe, et al. (2012). "Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study." *Vet Res Commun* **36**(2): 139-148.
- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(12): 885-896.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 145-171.
- Sabatini, F., L. Petecchia, et al. (2005). "Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities." *Lab Invest* **85**(8): 962-971.
- Saegusa, M., M. Hashimura, et al. (2012). "Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF-kappaB in endometrial carcinoma cells, modulating cell proliferation through alteration in the p14(ARF)/p53/p21(WAF1) pathway." *Am J Pathol* **181**(2): 684-692.
- Sasaki, M., R. Abe, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type." *J Immunol* **180**(4): 2581-2587.
- Shao, C. M., Q. S. Shao, et al. (2012). "[Association of SOX9 expression and prognosis in patients with gastric cancer]." *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **15**(7): 736-739.
- Shen, R., X. Wang, et al. (2006). "Cyclin D1-cdk4 induce runx2 ubiquitination and degradation." *J Biol Chem* **281**(24): 16347-16353.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Shi, G., K. C. Sohn, et al. (2013). "Expression and functional role of Sox9 in human epidermal keratinocytes." *PLoS One* **8**(1): e54355.
- Sock, E., R. A. Pagon, et al. (2003). "Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia." *Hum Mol Genet* **12**(12): 1439-1447.
- Soderstrom, M., T. Bohling, et al. (2002). "Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers." *Int J Cancer* **100**(2): 144-151.
- Song, Y. W., T. Zhang, et al. (2012). "Glucocorticoid could influence extracellular matrix synthesis through Sox9 via p38 MAPK pathway." *Rheumatol Int* **32**(11): 3669-3673.

- Spees, J. L., C. A. Gregory, et al. (2004). "Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy." *Mol Ther* **9**(5): 747-756.
- Sudbeck, P. and G. Scherer (1997). "Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9." *J Biol Chem* **272**(44): 27848-27852.
- Sudbeck, P., M. L. Schmitz, et al. (1996). "Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9." *Nat Genet* **13**(2): 230-232.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, et al. (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8395-8400.
- Tanaka, T., T. Kuroki, et al. (2013). "Evaluation of SOX9 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm." *Pancreas* **42**(3): 488-493.
- Tanaka, T., N. Yoshida, et al. (1997). "Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene." *EMBO J* **16**(24): 7432-7443.
- Tew, S. R. and T. E. Hardingham (2006). "Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization." *J Biol Chem* **281**(51): 39471-39479.
- Tong, Q., G. Dalgin, et al. (2000). "Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition." *Science* **290**(5489): 134-138.
- Topol, L., W. Chen, et al. (2009). "Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus." *J Biol Chem* **284**(5): 3323-3333.
- Tribioli, C. and T. Lufkin (1999). "The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen." *Development* **126**(24): 5699-5711.
- Troeberg, L. and H. Nagase (2012). "Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis." *Biochim Biophys Acta* **1824**(1): 133-145.
- Venkatesan, J. K., M. Ekici, et al. (2012). "SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells." *Stem Cell Res Ther* **3**(3): 22.
- Vidal, V. P., N. Ortonne, et al. (2008). "SOX9 expression is a general marker of basal cell carcinoma and adnexal-related neoplasms." *J Cutan Pathol* **35**(4): 373-379.
- Vincent, A. J., S. Ren, et al. (2012). "Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance: NUPR1 and p21 in chemoresistance." *FEBS Lett* **586**(19): 3429-3434.
- Wagner, T., J. Wirth, et al. (1994). "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9." *Cell* **79**(6): 1111-1120.
- Wang, H., L. He, et al. (2013). "SOX9 Regulates Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 6 (LRP6) and T-cell Factor 4 (TCF4) Expression and Wnt/beta-catenin Activation in Breast Cancer." *J Biol Chem* **288**(9): 6478-6487.
- Wang, H., N. C. McKnight, et al. (2007). "SOX9 is expressed in normal prostate basal cells and regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells." *Cancer Res* **67**(2): 528-536.
- Wang, L., S. He, et al. (2012). "Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma." *Med Oncol* **29**(5): 3484-3490.
- Wang, Y. and H. S. Sul (2009). "Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9." *Cell Metab* **9**(3): 287-302.
- Wegner, M. (1999). "From head to toes: the multiple facets of Sox proteins." *Nucleic Acids Res* **27**(6): 1409-1420.
- Weng, Z., A. C. Fluckiger, et al. (1998). "A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12334-12339.
- Wislet-Gendebien, S., F. Wautier, et al. (2005). "Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin." *Brain Res Bull* **68**(1-2): 95-102.
- Wu, J. H., X. A. Liang, et al. (2013). "Identification of DNA methylation of SOX9 in cervical cancer using methylated-CpG island recovery assay." *Oncol Rep* **29**(1): 125-132.

- Xie, W. F., X. Zhang, et al. (1999). "Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9." *J Bone Miner Res* **14**(5): 757-763.
- Yagi, R., D. McBurney, et al. (2005). "Bcl-2 positively regulates Sox9-dependent chondrocyte gene expression by suppressing the MEK-ERK1/2 signaling pathway." *J Biol Chem* **280**(34): 30517-30525.
- Yang, B. B., Y. Zhang, et al. (1998). "Aggrecan and link protein affect cell adhesion to culture plates and to type II collagen." *Matrix Biol* **16**(9): 541-561.
- Yang, K., M. Hitomi, et al. (2006). "Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell." *Cell Div* **1**: 32.
- Young, R. G., D. L. Butler, et al. (1998). "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." *J Orthop Res* **16**(4): 406-413.
- Zaucke, F. and S. Grassel (2009). "Genetic mouse models for the functional analysis of the periferillar components collagen IX, COMP and matrilin-3: Implications for growth cartilage differentiation and endochondral ossification." *Histol Histopathol* **24**(8): 1067-1079.
- Zhang, R., S. Murakami, et al. (2006). "Constitutive activation of MKK6 in chondrocytes of transgenic mice inhibits proliferation and delays endochondral bone formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(2): 365-370.
- Zhang, X., R. Cowper-Salari, et al. (2012). "Integrative functional genomics identifies an enhancer looping to the SOX9 gene disrupted by the 17q24.3 prostate cancer risk locus." *Genome Res* **22**(8): 1437-1446.
- Zhang, Y., X. Guo, et al. (2012). "MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma." *FEBS Lett* **586**(24): 4362-4370.
- Zhao, Q., H. Eberspaecher, et al. (1997). "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." *Dev Dyn* **209**(4): 377-386.
- Zhong, W. D., G. Q. Qin, et al. (2012). "SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors." *BMC Cancer* **12**: 248.
- Zhou, C. H., L. P. Ye, et al. (2012). "Clinical significance of SOX9 in human non-small cell lung cancer progression and overall patient survival." *J Exp Clin Cancer Res* **31**: 18.
- Zhou, G., Q. Zheng, et al. (2006). "Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 19004-19009.
- Zhu, X., J. Du, et al. (2012). "The comparison of multilineage differentiation of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells." *Clin Lab* **58**(9-10): 897-903.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." *Mol Biol Cell* **13**(12): 4279-4295.